

**Titel:       Regulatorische-T-Zellen enthaltend Galectine zur  
Therapie und Diagnose von Erkrankungen**

**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft regulatorische-T-Zellen enthaltend Galectine, insbesondere deren Verwendung als Marker sowie zur Therapie und Diagnose von Erkrankungen, insbesondere von Allergien, Autoimmunerkrankungen, insbesondere Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn, Chronischer Inflammation, Asthma, Immundefizienz-Erkrankungen, AIDS, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen sowie Diabetes.

Ferner betrifft die Erfindung geeignete Binder sowie ein Testsystem (Diagnostikum).

Das Immunsystem ist in der Lage zwischen fremden Proteinen und Strukturen des eigenen Körpers, aber auch zwischen harmlosen und pathogenen Antigenen zu unterscheiden und somit unnötige und autoaggressive Immunantworten zu vermeiden. Die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen, bei gleichzeitiger Entwicklung von protektiven Immunantworten gegen Pathogene, beruht im wesentlichen auf der Bildung antigenspezifischer Effektorzellen zur Immunabwehr und der Bildung von antigenspezifischen Suppressorzellen zur Erhaltung der immunologischen Toleranz.

Sakaguchi et al. beschreiben erstmals eine Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, charakterisiert durch eine konstitutive Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), die essentiell für die Kontrolle von autoaggressiven Immunantworten in Mäusen ist (Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151-1164).

Inzwischen wurden diese CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen Spezies, einschließlich des Menschen, als CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen identifiziert (kurz: Treg, im Folgenden genannt; charakterisiert durch die Koexpression der Oberflächenproteine CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup>), die als residente Population 5-10% der humanen peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen repräsentieren. Frisch isoliert sind CD25<sup>+</sup> Tregs anergisch, d.h. sie proliferieren nicht nach allogener oder polyklonaler Stimulation, supprimieren aber die Proliferation und Zytokinbildung konventioneller CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese Suppression ist zellkontakt- und

aktivierungs-abhängig, aber antigen-unspezifisch [Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H. (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193, 1285-1294; Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193, 1303-1310; Ng, W. F., Duggan, P. J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A. D., Isaacs, J. D., and Lechler, R. I. (2001) Human CD4+ CD25+ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98, 2736-2744; Seddon, B. and Mason, D. (2000) The third function of the thymus. *Immunol. Today* 21, 95-99; Seddon, B. and Mason, D. (1999) Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J. Exp. Med.* 189, 877-882; Thornton, A. M. and Shevach, E. M. (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188, 287-296; Suri-Payer, E., Amar, A. Z., Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (1998) CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 160, 1212-1218; Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2001) Cutting Edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 167, 1137-1140].

Die Depletion der Tregs *in vivo* resultiert in einer Reihe von Autoimmunkrankheiten, aber auch in einer verbesserten Tumorabwehr (Sakaguchi (supra)). Dieser Befund stützt die These einer ambivalenten Funktion der Tregs. Einerseits verhindern sie die Entstehung autoaggressiver Immunreaktion, andererseits erschweren sie aber

gleichzeitig eine effektive Tumorabwehr, da Tumorzellen i.a. immunologisches „Selbst“ repräsentieren und deshalb ihre Elimination durch Effektor-T-Zellen von Tregs unterbunden wird. Die Steigerung der supprimierenden Funktion von Tregs wird als hilfreich für die Therapie insbesondere von Autoimmun-Erkrankungen angesehen, während eine transiente Hemmung ihrer supprimierenden Eigenschaften die Tumorabwehr unterstützen kann.

Die Tatsache, dass die supprimierenden Eigenschaften zellkontaktabhängig sind, macht deutlich, dass insbesondere Treg-spezifische Moleküle (Marker, Target) einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben und die Basis bilden für die gezielte Ausnutzung dieser Eigenschaften zu therapeutischen und diagnostischen Zwecken im Bereich von Allergien, Autoimmunerkrankungen, Chronischer Inflammation, Immundefizienz-Erkrankungen, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen sowie AIDS, Diabetes.

Mit Hilfe der Proteomanalyse wurde gezielt die Proteinzusammensetzung der einzelnen T-Zellsubpopulationen, insbesondere der Treg (also  $CD4^+CD25^+$  und  $CD4^+CD25^+\beta7^-$ -Subpopulationen), untersucht und spezifisch Treg - eigene Proteine identifiziert.

Überraschender Weise konnten mit Hilfe der Proteomanalyse  $\beta$ -Galactosidase-bindende Proteine (kurz: Galectine, im Folgenden) wie Galectin-1 und Galectin-10 (so genanntes Charcot-Leyden Crystal (CLC) Protein) identifiziert werden.

Galectine sind z.B. in Ni et al. WO 98 / 015624 A1 und Ackerman et al. US 5,242,807 beschrieben. Jedoch wird die spezifische Eignung der Galectine zur Manipulation und Modifikation von Treg nicht erkannt.

Daher betrifft die Erfindung Treg enthaltende Galectine und deren Isolierung. Daher sind Galectine in Tregs geeignete Marker oder Target.

Im Rahmen dieser Erfindung wird unter „Treg“ solche T-Zellsubpopulationen verstanden, die humanen Ursprungs sind oder aus Säugetieren stammen können. Bevorzugt sind jedoch erfindungsgemäß die Subpopulationen Treg-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und Treg-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>β7<sup>+</sup>. „Isolierte Treg“ sind ex-vivo Zellen (außerhalb des lebenden Körpers) und ggfs. von anderen T-Zellen getrennt. Mittels Isolation ist ebenfalls eine Anreicherung von Treg-Zellen enthaltend Galectin möglich (siehe Beispiele).

Der Begriff „native Treg“ beschreibt „in-vivo“ (innerhalb des lebenden Körpers) vorzufindende Treg, z.B. im menschlichen Blut oder Thymus oder von Säugetieren.

„Galectine“ im Sinne dieser Erfindung sind solche Proteine mit der Funktion eines β-Galactosidase-bindenden Proteins, also solche Galectine, wie Galectin 1-14 als humanes Galectin oder als homologes Protein aus Mensch oder Säugetieren. Bevorzugt sind jedoch erfindungsgemäß Galectin 1 oder 10, insbesondere gemäß einer der Sequenzen SEQ ID No. 1 - 5. Des weiteren kann Galectin 10 als SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 in seinen Isoformen auftreten und zwar: a.) apparentes Molekulargewicht von 14 kDa und einen pI von 6,7, b.) apparentes Molekulargewicht von 13,5 kDa und einen pI von 5,9, c.) apparentes Molekulargewicht von 13 kDa und einen pI von 5,9.

Daher können die Isoformen a.), b.) und c.) ebenfalls in einer trunkierter Form vorliegen und ggfs. acetyliert sein, entsprechend den Sequenzen SEQ ID No. 8-64.

Ebenfalls können die erfindungsgemäßen Galectine modifiziert sein, z.B. mittels posttranslationalen Modifikationen, wie Glykolisierung.

Beispiele von Galectinen sind gegeben in WO 98 / 015624 A1 und Galectin 10 ist offenbart in Ackerman et al. US 5,242,807. Diese Galectine sind erfindungsgemäß mit eingeschlossen.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Treg enthaltend Galectine, dahingehend rekombinant verändert, dass sie eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz, vorzugsweise SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 2 oder SEQ ID No. 4, oder erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise SEQ ID No. 6 oder SEQ ID No. 7, enthalten.

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls die Aminosäuresequenzen SEQ ID No. 1-5 bzw. Polypeptide oder Proteine und deren codierenden Nukleinsäuresequenzen. Insbesondere SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 (Galectin 10) zeigen lediglich eine Übereinstimmung von 60% mit entsprechenden angegebenen Sequenzen in WO 98 / 015624 A1. Dies ist in der erfindungsgemäßen spezifischen Treg-Herkunft begründet.

Daher betrifft die Erfindung auch solche Aminosäure-Sequenzen (Polypeptide, Proteine), die eine Sequenzidentität oder Homologie von 70% und mehr, vorzugsweise von 80% und mehr, besonders bevorzugt von 90-95% und mehr mit SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 aufweisen. Ebenfalls mit eingeschlossen sind ebenfalls solche analoge Aminosäure-Sequenzen, die aufgrund des Austausches von einer oder mehreren Aminosäure(n) in diesen Sequenzen, dennoch die gewünschte Funktion eines Galectins gewährleisten.

In einer weiteren Ausführungsform sind ebenfalls Fusionsproteine betroffen, enthaltend eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz oder ein genanntes Galectin als eine Teilsequenz. Beispiele für rekombinante Fusionsproteine sind gegeben in EP 282 042 B1 (His-Tag).

Des weiteren betrifft die Erfindung Nukleinsäuren, die für ein Galectin kodieren und zwar vorzugsweise für ein Galectin erhältlich aus einem Treg oder für die erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen codieren.

Insbesondere können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 6 sein, codierend für SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 (Galectin 10) oder eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 7 sein, codierend für SEQ ID No. 4 (Galectin 1).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine Poly(A)-Sequenz, eine oder mehrere Erkennungssequenzen sowie, falls erforderlich, eine oder mehrere potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die nicht-kodierenden Sequenzen sind regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression des kodierenden Gens, enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren. Des weiteren können solche Nukleinsäuren Gegenstand von üblichen Expressionsvektoren, üblichen Wirtszellen oder üblichen gentherapeutischen Vektoren sein (z.B. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA oder Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)).

Der Begriff „Nukleinsäure“ (synonym: Polynukleotid) hat die

Bedeutung im Sinne von DNS oder RNS oder chemischen Analoga und dergleichen.

Die erfindungsgemäßen Galectine können sekretieren und an membranständige Proteine auf Treg oder Effektorzellen binden. Darüber hinaus können sie solche membranständigen Proteine quervernetzen und daher deren Funktionen beeinflussen und regulieren. Diese Eigenschaft kann erfindungsgemäß genutzt werden, um die Interaktion zwischen Treg und T-Effektorzellen zu beeinflussen, z.B. zwecks Behandlung von Krankheiten die mit Treg oder einer Effektorzellen in Verbindung stehen.

Ferner können die erfindungsgemäßen Galectine im Cytosol der Tregs vorliegen. Daher betrifft die Erfindung solche Treg, wobei mindestens ein Galectin sekretiert, membranständig oder auf der Oberfläche oder im Cytosol präsentiert ist.

Mit Hilfe von rekombinanten Methoden kann mindestens ein Galectin im Treg oder auf der Oberfläche der Treg angereichert werden. Hierzu kann eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz oder Nukleinsäure in Treg eingebracht werden.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen „Treg enthaltend Galectine“, dahingehend rekombinant verändert, dass sie eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz, vorzugsweise SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 oder SEQ ID No. 4, oder erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise SEQ ID No. 6 oder SEQ ID No. 7, enthalten.

Die Erfindung betrifft weiterhin Binder an mindestens einer isolierten regulatorischen T-Zelle oder nativen regulatorischen T-Zelle enthaltend mindestens ein Galectin. Die Binder können nicht abschließend ausgewählt werden aus



der Gruppe: Inhibitor, Agonist, Antagonist, Sonde, Antikörper oder Immunmodulator.

Der Binder kann auch ein Signal induzieren, wie eine Farbreaktion, radioaktive Markierung, welches genügt ein Treg enthaltend Galectine zu identifizieren und zu modifizieren. Daher kann der Binder eine „Sonde“ sein. Im weitesten Sinne ist daher der Binder erfindungsgemäß ebenfalls ein adressiertes Molekül, welcher an einen geeigneten signal-vermittelnden Rezeptor an Treg enthaltend Galectin bindet und aufgrund des enthaltenden Galectins in Treg eine Rückkopplung erzeugt.

Beispielsweise können mittels eines Inhibitors oder Modulators Galectine in Treg vorteilhaft angereichert werden. Mit Hilfe einer Sonde können ebenfalls z.B. weitere Treg Zellen enthaltend Galectine identifiziert werden. Eine solche Sonde ist beispielsweise ein Antikörper, der spezifisch ein oder mehrere vorhandene Epitope auf den erfindungsgemäßen Aminosäure-Sequenzen (z.B. SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2) oder Galectinen erkennt (Herstellung z.B. einschlägig nach Köhler).

Ferner kann der erfindungsgemäße Binder ein oder mehrere Epitope enthalten, wobei ein oder mehrere Epitope gegen Galectine, und ein oder mehrere Epitope gegen Oberflächenproteine auf Treg oder Effektorzellen, insbesondere mit der Eignung Oberflächenproteine quervernetzten, solche wie nicht abschließend z.B. CD25, CD44, CD45, GITR, CTLA-4, Fox P3.

In einer funktionellen Betrachtungsweise haben die Binder die Funktion, den isolierten Treg oder nativen Treg enthaltend mindestens ein Galectin zu aktivieren oder zu deaktivieren.

Daher sind die Treg enthaltende Galectine oder Binder als Arzneimittel geeignet, vorzugsweise zur Behandlung und Therapie von Erkrankungen und zwar von Allergien, Autoimmunerkrankungen, insbesondere Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn, Chronischer Inflammation, Asthma, Immundefizienz-Erkrankungen, AIDS, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen sowie Diabetes. Insbesondere solche Autoimmunerkrankungen ausgewählt aus der Gruppe: Alopecia Areata, Morbus Bechterew, Antiphospholipid-Syndrom, Morbus Addison, Morbus Behcet, Zöliakie Sprue, chronische Müdigkeitssyndrom (Chronic Fatigue Immune Dysfunction Syndrome (CFIDS)), Polyneuropathie, Churg-Strauss Syndrom (Granulomatose), CREST-Syndrom (Raynaud-Syndrom), Cold Agglutinin Disease, Kryoglobulinämie, Fibromyalgie, Fibromyositis, Morbus Basedow, Guillain -Barré-Syndrom, idiopathische pulmonäre Fibrose, idiopathische Thrombozytopenie, IgA Nephropathie, Lichen Planus, Morbus Ménière, Polyarteritis Nodosa, Polychondritis, Polyglandular-Syndrom, Polymyalgia Rheumatica, Primary Agammaglobulinemie, Biliäre Cirrhose, Psoriasis, Morbus Reiter, Sarkoidose, Morbus Sjögren, Takayasu-Arteritis, Vasculitis, Vitiligo, Wegeners Granulomatose.

Isolierte Treg enthaltend Galectine, entsprechend erfindungsgemäß modifiziert, können dem zu behandelnden Körper appliziert werden. Zum anderen können geeignete Binder dem Patienten in ausreichender Dosierung verabreicht werden. Die Treg enthaltende Galectine und/oder Binder werden hierzu ggfs. mit weiteren Hilfsstoffen formuliert.

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der Galectine in Treg als Marker oder Target.

Insbesondere können die Galectine als Target dienen für die Manipulation bzw. Modulation der supprimierenden Eigenschaften eines Tregs. Dies kann beispielsweise mittels eines Binders oder einer Substanz erfolgen. Ferner kann der Binder oder die Substanz ein Inhibitor sein, der die Expression des Galectins unterbindet, hemmt oder fördert. Ferner können die Treg-spezifischen Galectine als Marker dienen um Treg mit (erhöhten) supprimierenden Eigenschaften zu identifizieren.

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Testsystem enthaltend zumindest einen Binder und mindestens einen Treg enthaltend Galectine, zur Identifikation geeigneter Binder oder Treg, vorzugsweise solcher mit erhöhten supprimierenden Eigenschaften.

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Testsystem umfassend mindestens ein Treg enthaltend Galectine und mindestens eine Zielzelle, insbesondere T-Zelle, B-Zelle, Makrophage, Prädendritische Zelle, Dendritische Zelle, embryonale Zelle und / oder Fibroblast, die mit mindestens einem Treg inkubiert werden zum in-vitro Nachweis supprimierender Eigenschaften, insbesondere zellulärer Immunantwort von Effektorzellen des Immunsystems, insbesondere B-Zellen, NK-Zellen, vorzugsweise T-Zellen, T-Helferzellen.

Aufgrund der besonderen zellkontaktabhängigen supprimierenden Eigenschaften der Treg enthaltenden Galectine können im erfindungsgemäßen Testsystem die zelluläre Immunantwort der Zielzellen geprüft werden.

Eine Immunantwort kann beispielsweise durch die Synthese von Cytokinen wie z.B. gamma-Interferon, Interleukinen nachgewiesen werden. Das entsprechende Cytokin sammelt sich

in diesem Testsystem intrazellulär an und kann über fluoreszenzgekoppelte Antikörper (z.B. ELISA) nachgewiesen werden. Ferner mittels Expression von Oberflächenmolekülen, Lyse der Zielzelle oder Zellproliferation. In einem FACS (fluorescent activated cell sorter) kann der Anteil der Immunzellen bestimmt werden, die sich stimulieren bzw. nicht-stimulieren oder aktivieren bzw. deaktivieren lassen. Weitere Nachweisverfahren sind nicht abschließend Cytokinassay, ELISPOT, Proliferationstests oder 51Cr-Freisetzungstests (siehe hierzu Allgemein: Current Protocols of Immunology (1999), Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. und Strober W., John Wiley & Sons). Bevorzugt sind jedoch nicht-radioaktive Nachweisverfahren.

In einer weiteren Ausführungsform sind die Effektorzellen, Säugerzellen, insbesondere humane oder murine Zellen oder Immunzelllinie und / oder kultivierte primäre Immunzelle.

In einer weiteren Ausführungsform wird dem Testsystem mindestens eine weitere Substanz inkubiert, die eine Immunantwort auslösen können, wie beispielsweise Proteine, Epitope, Proteinfragmente, Antigene.

Ferner ist ein solches Testsystem geeignet zur Identifikation von erfindungsgemäßen Bindern.

Des weiteren betrifft die Erfindung ein Diagnostikum (Synonym: Array oder Assay) zur Ausführung der erfindungsgemäßen Testsysteme und gegebenenfalls einen pharmazeutischen akzeptablen Träger.

Beispiele von pharmazeutisch akzeptablen Trägern sind Glas, Polystyren, Polypropylen, Dextran, Nylon, Amylase, natürliche oder modifizierte Zellulose, Polyacrylamide,

Agarose, Aluminiumhydroxid oder Magnitid. Ferner kann der Träger aus 96 Wellplatten und höher bestehen.

Das Diagnostikum kann in Lösung vorliegen, an eine feste Matrix gebunden sein und / oder mit einem Adjuvans versetzt sein.

Ferner kann das Diagnostikum an einen Patienten beliebig in vivo appliziert werden (z.B. Kapsel, Tablette).

Ein erfindungsgemäßes Diagnostikum ist daher geeignet zur Diagnose von Krankheiten und zwar von Allergien, Autoimmunerkrankungen, insbesondere Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn, Chronischer Inflammation, Asthma, Immundefizienz-Erkrankungen, AIDS, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen sowie Diabetes.

Insbesondere von Autoimmunerkrankungen und zwar Alopecia Areata, Morbus Bechterew, Antiphospholipid-Syndrom, Morbus Addison, Morbus Behcet, Zöliakie Sprue, chronische Müdigkeitssyndrom (Chronic Fatigue Immune Dysfunction Syndrome (CFIDS)), Polyneuropathie, Churg-Strauss Syndrom (Granulomatose), CREST-Syndrom (Raynaud-Syndrom), Cold Agglutinin Disease, Kryoglobulinämie, Fibromyalgie, Fibromyositis, Morbus Basedow, Guillain -Barré-Syndrom, idiopathische pulmonäre Fibrose, idiopathische Thrombozytopenie, IgA Nephropathie, Lichen Planus, Morbus Ménière, Polyarteritis Nodosa, Polychondritis, Polyglandular-Syndrom, Polymyalgia Rheumatica, Primary Agammaglobulinemie, Biliäre Cirrhose, Psoriasis, Morbus Reiter, Sarkoidose, Morbus Sjögren, Takayasu-Arteritis, Vasculitis, Vitiligo, Wegeners Granulomatose.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung, ohne die Erfindung auf diese zu beschränken.

Zudem werden Figuren und Sequenzen erläutert.

## Beispiele

### Beispiel 1: Isolierung und funktionelle Analyse humaner Treg

Die Isolierung der T-Zellen erfolgte aus PBMC (peripheral blood mononuclear cells), die durch eine Standard-Dichtegradientenzentrifugation aus normalen buffy coats oder Leukapherisaten gesunder humaner Spender.

#### Beispiel 1a: CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen (CD25+ Tregs)

Als Ausgangsmaterial dient das Leukapherisat freiwilliger, gesunder Spender, welches von der Transfusionszentrale Mainz hergestellt wird und im Durchschnitt  $7-10 \times 10^9$  Leukozyten enthält.

Im ersten Arbeitsschritt werden die mononukleären Zellen mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation isoliert und anschließend intensiv mit PBS + 1 mM EDTA gewaschen.

Anschließend werden die isolierten Leukozyten in PBS + 0,5% HSA (humanes Serumalbumin) + 1 mM EDTA aufgenommen und mit anti-CD25 Microbeads (2  $\mu$ l Microbeads/10<sup>7</sup> Leukozyten, Microbeads: Miltenyi GmbH, Bergisch-Gladbach, BRD) für 15 min. bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Leukozyten 2x mit PBS + 1 mM EDTA gewaschen.

Zur Isolierung der CD25+ Leukozyten werden die Zellen anschließend auf eine Separationssäule aufgetragen (LS Columns, Miltenyi) und im Dauermagneten (Miltenyi) separiert. Die durchschnittliche Ausbeute an CD25+ Leukozyten beträgt 1,2-2% (Reinheit > 97%).

Zur Depletion CD4-negativer Kontaminationen werden die CD25+ Leukozyten anschließend mit CD8-, CD19-, CD14-

Dynabeads (DynaL, Hamburg, BRD, 3 Beads/Zelle) und Maus-IgG1-anti-human-CD45RA monoklonalen Antikörpern (Coulter/Immunotech, Hamburg, BRD, 1 µg mAk/10<sup>6</sup> Leukozyten) 20 min. in X-VIVO-15 inkubiert. Die gebundenen CD8+, CD19+ und CD14+ Kontaminationen können direkt mit Hilfe eines Permanentmagneten (DynaL) entfernt werden, die CD45RA+ Zellen werden mit anti-Maus-IgG-DynaLbeads (DynaL) im Permanentmagneten entfernt. Dieser Depletionsschritt wird anschließend nochmals wiederholt (Reinheit der CD4+CD25+ Leukozyten > 95%).

Beispiel 1b:  $\alpha 4\beta 1+$  und  $\alpha 4\beta 7+$  Subpopulationen humaner regulatorischer T-Zellen

Humane CD25+ Tregs enthalten zwei funktionell unterschiedliche Subpopulationen, die sich in der Expression von Integrinen unterscheiden. Ca. 20% der Tregs exprimieren das  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, 80% das  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin. Zur Isolation dieser Subpopulationen sind folgende Änderungen des Isolierungsprotokolls notwendig:

Im ersten Arbeitsschritt werden die isolierten Leukozyten 15 min. bei 4°C mit Maus-IgG-anti-Human-CD25-FITC mAk (2 µl mAk/10<sup>7</sup> Leukozyten, M-A251, BD PharMingen, San Diego, USA) inkubiert und anschließend intensiv mit PBS + 1 mM EDTA gewaschen.

Die FITC-positiven Zellen werden mit Hilfe von anti-FITC-Multisort-Microbeads (Miltenyi) isoliert. Das Verfahren wird analog der direkten Isolation von CD25+ Leukozyten mit CD25-Microbeads durchgeführt. Anschließend werden die Microbeads mittels enzymatischem Verdau, nach Angaben des Herstellers (Miltenyi), von der Oberfläche der Leukozyten entfernt.

Die Depletion der CD4-negativen Kontaminationen erfolgt wie zuvor beschrieben mit CD8-, CD19- und CD14-Dynabeads, CD45RA+ Zellen werden nicht depletiert (Reinheit CD4+CD25+

T-Zellen > 95%).

Im nächsten Arbeitsschritt wird die  $\alpha 4\beta 7+$  Subpopulation isoliert. Hierfür werden die CD4+CD25+ T-Zellen mit einem Ratte-IgG-anti-human- $\beta 7$ -Integrin-PE mAk (BD-PharMingen, 2  $\mu$ l/107 Zellen) für 15 min. bei 4°C inkubiert und anschließend intensiv mit PBS + 1 mM EDTA gewaschen. Die Verfahren zur Isolierung der  $\beta 7+$  T-Zellen erfolgt analog zur Isolation CD25+ T-Zellen mit Hilfe von anti-PE-Microbeads (Miltenyi) resultierend in einer Reinheit von CD4+CD25+ $\alpha 4\beta 7+$  Zellen > 90%. Die negative Fraktion exprimiert das Integrin  $\alpha 4\beta 1$  (Reinheit CD4+CD25+ $\alpha 4\beta 1+$  Zellen > 80%).

Beispiel 2: Charakterisierung humaner CD4+CD25+ regulatorischer T-Zellen

CD25+ Tregs sind durch ihre inhibitorische Wirkung auf die Aktivierung von CD4+ und CD8+ T-Zellen in vitro charakterisiert.

Die funktionelle Charakterisierung CD25+ Tregs in vitro wird in Kokulturassays mit CD4+ T-Helferzellen analysiert. Hierzu werden die T-Zellen entweder mit allogenen, reifen dendritischen T-Zellen oder polyklonal mit anti-CD3 + anti-CD28 mAk stimuliert.

Beispiel 3: Multisort positive Selektion von CD4+CD25+ und CD4+CD25+ $\beta 7+$  T-Zellen

Die Isolierung von Treg erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurden CD4+ T-Zellen mit Hilfe des CD4-MACS-Multisort-Kits (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany) isoliert und daraus mit anti-CD25-FITC (M-A251, BD PharMingen, San Diego, USA) und anti-FITC-Multisort Beads (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany) die CD4+CD25+ T-



Zellen. Daran anschließend wurden B-Zellen, Makrophagen und CD8+ T-Zellen mittels CD19, CD14 und CD8 Dynabeads (Dyna, Hamburg, Germany) depletiert. Für die Isolierung von CD4+CD25+ $\beta$ 7+ Treg (Subpopulation der CD4+CD25+ Treg) wurden  $\beta$ 7-PE und anti-PE Beads (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany) verwendet. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mit der FACS-Analyse kontrolliert.

#### Beispiel 4: Funktionelle Analyse humaner frisch isolierter CD4+CD25+ T-Zellen

CD25 ist ein typisches Oberflächenmolekül auf Treg, jedoch wird es nicht nur in diesem Zelltyp exprimiert. Aus diesem Grund wurde vor jeder Analyse eine funktionelle Kontrolle der supprimierenden Eigenschaften der isolierten Zellen durchgeführt.

#### Beispiel 5: Polyklonale Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern

Eine konstante Anzahl von konventionellen CD4+ T-Zellen ( $1 \times 10^5$ /Kavität) kann polyklonal aktiviert werden und zwar mit anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml, OKT-3) und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern (2  $\mu$ g/ml, CD28.2) in Gegenwart von einer variierenden Anzahl von CD4+CD25+ T-Zellen (Verhältnis 1:1 bis 1:4). Die T-Zellproliferation wurde gemessen nach drei Tagen Kultivierung und einer anschließenden 16stündigen gepulsten Behandlung mit 3HTdR (37 kBq/well). Die derart getesteten Zellen wurden für die Proteomanalysen verwendet. Gesamtzelllysate aus kultivierten Zellen für die 2DE

Die Extraktion der Proteine aus den Zellen nach einer Zelllyse erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode nach Klose (Klose, J. und Kobalz, U., Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome.

Electrophoresis 16, 1034-1059 (1995) und Klose, J. Fractionated extraction of total tissue proteins from mouse and human for 2-D electrophoresis. Methods Mol Biol 112, 67-85 (1999)). Die Zellen wurden in einem Phosphat-Puffer, der Proteaseinhibitoren gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Proteasen enthielt mechanisch mittels Ultraschall und Glaskugeln lysiert. Die 2D-Gelelektrophorese störenden Nukleinsäuren wurde bei Raumtemperatur innerhalb von 20 min durch Zugabe der Nuklease Benzonase verdaut. Die Proteine wurden in einem Harnstoff- und Thioharnstoffhaltigem Puffer mit Zusatz von DTT gelöst. Für die Isoelektrische Fokussierung der Proteine wurden Servalyte 2-4 zugesetzt.

#### Beispiel 6: Proteintrennung mittels 2DE

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine erfolgte nach der Methode von Klose (Klose, J., Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik, 26, 231-243 (1975)) mit Trägerampholyten in Rundgelen aus Polyacrylamid unter reduzierenden Bedingungen. Die Trennungen wurden in einem pH-Bereich von 2 bis 11 durchgeführt, wobei die Länge der IEF-Gele 40 cm betrug. Die Proteinseparation der über IEF separierten Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte in 15%igen Polyacrylamidgelen. Vor dem Auftrag auf das Gel für die SDS-PAGE wurden die IEF-Gelstränge zweimal mit Laufpuffer (0,3 % (w/v) Tris Base, 1,44 % (w/v) Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) gewaschen, um überschüssiges DTT zu entfernen. Anschließend wurde der Gelstrang luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und mit einer 1%igen Agaroselösung (mit Bromphenolblau) fixiert. Der Eintritt der Proteine in das Gel erfolgte bei 65 mA für 15 min und die Trennung innerhalb von ca. 5 h bei 100 mA für 0,75 mm dicke

analytische Gele bzw. bei 75 und 200 mA für 1,0 bzw. 1,5 mm dicke präparative Gele. Die Trennstrecke betrug 30 cm.

#### Visualisierung der Proteine

Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit in der Proteindetektion zu erlangen, erfolgte die Färbung analytischer Gele mit Silber nach einer modifizierten Methode von Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven, J. und Dernick, R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. Electrophoresis 9, 28-32 (1988)) modifiziert nach Klose und Kobalz (Klose, J. und Kobalz, U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis 16, 1034-1059 (1995)). Da diese Methode einen Zusatz von Glutardialdehyd und Formaldehyd nutzt, um die Empfindlichkeit zu erhöhen, ist eine anschließende massenspektrometrische Identifizierung der Proteine kaum möglich. Aus diesem Grund wurde bei Bedarf eine modifizierte Variante der mit Massenspektrometrie kompatiblen Färbung nach Blum et al. (Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8, 93-99 (1987)) eingesetzt. Die kolloidale Coomassie-Färbung nach Neuhoff et al. (Neuhoff V., Arold N., Taube D. und Ehrhardt W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9, 255-262. (1988)) mit Coomassie Brilliant Blue G-250 wurde für die Proteine in präparativen 2DE-Gelen verwendet, die massenspektrometrisch untersucht wurden. Alternativ, insbesondere für Proteine, die mit der kolloidale Coomassie-Färbung nicht angefärbt werden konnten wurden mit Silber nach einem modifizierten Protokoll ohne den Zusatz von Glutardialdehyd (Blum, H., Beier, H. und

Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 8, 93-99 (1987)) angefärbt.

#### Beispiel 7: Differenzielle Proteomanalyse

Das Digitalisieren der Polyacrylamidgele erfolgte bei silbergefärbten Gelen für die Bildauswertung nach dem Trocknen der Gele mit einem Durchlichtscanner.

Die quantitative Auswertung der relativen Proteinintensitäten erfolgte mit einer speziellen, für diese Analysen geeigneten Bildauswertungssoftware (ProteomWeaver Vers. 2.0, Definiens, Deutschland).

Die mit Hilfe der Bildauswertung gefundenen Proteine wurden manuell aus den Gelen herausgeschnitten. Mit Hilfe eines Waschroboters wurden die Gelstücke abwechselnd jeweils dreimal alternierend mit jeweils 10 µl Verdaupuffer (10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) bzw. Verdaupuffer/Acetonitril 1:1 gewaschen, um den Farbstoff und Pufferzusätze zu entfernen. Bei silbergefärbten Spots wurde das Silber vor dem Waschen durch Zugabe von 15 µl Entfärbelösung (100 mM Kaliumhexacyanoferrat(III)/30 mM Natriumthiosulfat, 1:1) bei Raumtemperatur innerhalb von ca. 1 min oxidiert. Anschließend wurden die Gelstücke in der Vakuumzentrifuge dehydratisiert und mit jeweils 2 µl einer Trypsinlösung (0,05 µg/µl Trypsin in Verdaupuffer) versetzt. Die proteolytische Spaltung erfolgte bei 37 °C für mindestens 4 h oder über Nacht. Die entstandenen Proteolyseprodukte wurden innerhalb von 30 min durch Zugabe von 5 µl 0,1%iger TFA bei Raumtemperatur aus der Gelmatrix extrahiert.

#### Beispiel 8: MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Peptidmassen von proteolytisch

gespaltenen Proteinen erfolgte mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer des Typs Ultraflex (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland). Bei dieser Methode werden die Analytmoleküle (Peptide) in einer UV-aktiven Matrix kokristallisiert. Für die Matrixlösung wurde eine gesättigte  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure-Lösung in 50 % Acetonitril/0,1 % TFA 1:1 (Lösung A) mit Lösung A im Verhältnis 1:1 verdünnt. Vor den Messungen wurden die Peptide zur Anreicherung an C18-Material in ZipTips<sup>TM</sup> (aktiviert durch 10  $\mu$ l 0,1 % TFA) durch mehrmaliges Aufziehen der Analytlösung adsorbiert, einmal mit 10  $\mu$ l 0,1 % TFA gewaschen und anschließend mit 1,2  $\mu$ l Matrixlösung auf den Probenhalter eluiert. Die sogenannten Peptidmassenfingerprintspektren (PMFs) der auf dem Probenhalter getrockneten Proben wurden bei folgenden Einstellungen vermessen: Akquisitionsmethode: Reflektor, Spannungspolarität: positiv, Beschleunigungsspannung: 25 kV, Reflektorspannung: 26,3 kV, Linsenspannung: 6,2 kV, Reflektordetektorspannung: 1,72 kV und Deflektionsspannung: 0 kV

Die Kalibrierung der Massenspektren erfolgte durch einen Kalibrierungsalgorithmus der Proteinscape®-Datenbank (Bruker Daltonik) automatisch auf Autoproteolyseprodukte des Trypsins und auf bekannte, immer wieder in den Spektren vorkommende Peptide aus Kontaminationen wie z.B. Keratin.

Die Peptidmassen-Spektren wurden unter Zuhilfenahme einer nichtredundanten NCBI Proteindatenbank mit Hilfe der Metasuchmaschine aus Proteinscape® und den Suchalgorithmen MASCOT und ProFound (Version 2002.03.01) analysiert.

#### Auswertung:

Bei dem Vergleich der unterschiedlichen T-Zellpopulationen wurde eine Erhöhung der Proteinmenge des Charcot-Leyden Crystal Proteins (Galectin 10) in stimulierten und nicht stimulierten CD4+CD25+ T-Zellen gegenüber den nicht stimulierten CD4+ T-Zellen gefunden. Diese Ergebnisse

wurden in vier voneinander unabhängigen humanen Spendern gefunden. Bei zwei Spendern wurde eine Erhöhung der Proteinmenge des Charcot-Leyden Crystal Proteins auch in einer stimulierten CD4+CD25+ $\beta$ 7+ T-Zell-Subpopulation (Treg) gefunden (Figur 1, Figur 2, Figur 3).

Das Charcot-Leyden Crystal Protein wurde in den Gelen in drei Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt detektiert und identifiziert.

Isoform 1 (Spot 68) hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 14 kDa und einen pI von 6,7, Isoform 2 (Spot 33) hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 13,5 kDa und einen pI von 5,9, Isoform 3 (Spot 34) hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 13 kDa und einen pI von 5,9.

Alle Isoformen wurden als Charcot-Leyden Crystal Protein (Galectin 10) identifiziert (SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2).

Die drei Isoformen zeigten bei den untersuchten T-Zell-Populationen eine Koregulation.

Galectin 1 (SEQ ID No. 4) wurde ebenfalls in einer höheren Proteinkonzentration in den in stimulierten und nicht stimulierten CD4+CD25+ T-Zellen gegenüber den nicht stimulierten CD4+ T-Zellen gefunden.

Diese Ergebnisse wurden in vier unabhängigen humanen Spendern gefunden. Bei zwei Spendern wurde eine Verringerung der Proteinmenge des Galectin 1 in CD4+CD25+ $\beta$ 7+ T-Zell-Subpopulation (Treg) gefunden (Figur 4).

Vergleichende Untersuchungen an denselben Zellpopulationen wurden auch bei Mäusen durchgeführt (verwendeter Inzuchtstamm: BALB/c). Die Sequenzen der entsprechenden Galectin-Proteine sind SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 5.

Beispiel 9: Isolierung und Stimulierung humaner T Zellpopulationen

Konventionelle CD4+CD25- T-Effektorzellen (im weiteren Text als CD4+ T-Zellen benannt) und CD4+CD25+ T-Zellen (im weiteren Text als CD25+ Treg Zellen) wurden aus buffy coats und Leukapherisaten gesunder humaner Spender isoliert. CD25+ Zellen wurden mittels CD25-Microbeads (Miltenyi) isoliert. Dies resultierte in CD25<sup>high</sup> Zellen. Anschließend wurden Kontaminationen von CD4- Zellen durch Depletion CD14-, CD8-, und CD19-Dynabeads (Dyna). Dieser Reinigungsschritt resultierte in einer Population von CD4+CD25<sup>high</sup> T-Zellen in einer Reinheit von > 95%. (Teilweise wurden CD25+CD45RO+ T-Zellen mit Hilfe von anti-CD45RO mAb (Pharmingen) in Kombination mit anti-mouse IgG Dynabeads depletiert. Hieraus resultierte eine CD4+CD25+CD45RO+ T-Zellen (Reinheit > 96%). CD4+CD25- T-Zellen wurden mit Hilfe von CD4-Microbeads isoliert und anschließend CD25+ von T-Zellkontaminationen mit CD25-Dynabeads depletiert (Reinheit der CD4+CD25- T-Zellen > 98%). Für einen Teil der Analysen wurden  $\alpha$ 4 $\beta$ 7+ und  $\alpha$ 4 $\beta$ 1+ Treg Subsets isoliert. Die CD4+CD25+ T-Zellen wurden mit Hilfe von anti-CD25-FITC mAb in Kombination mit anti-FITC-Multisort-Beads (Miltenyi) isoliert und anschließend durch die Depletion von CD4- Kontaminationen weiter aufgereinigt. Das  $\beta$ 7-integrin-positive Subset der Treg Zellen wurde unter Verwendung von anti- $\beta$ 7-integrin-PE mAb in Kombination mit anti-PE Microbeads isoliert und resultierte in zwei Populationen: CD4+CD25+  $\beta$ 7+ T-Zellen (Reinheit > 95%, positiv selektiert) und CD4+CD25+  $\beta$ 7- T-Zellen (Reinheit > 90%, negativ selektiert). Für die polyclonale Aktivierung der T-Zellen wurden 1  $\mu$ g/ml anti-CD3 (OKT-3) und 2  $\mu$ g/ml anti-CD28 (CD28.2, Pharmingen) verwendet. Für Proliferationsassays der Zellen wurde eine sub-optimale Stimulierung der Zellen mit 0.5 $\mu$ g/ml anti-CD3 (OKT-3) und Gamma-Strahlen inaktivierte PBMC benutzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte immer in serumfreiem X-VIVO-15 Medium (Cambrex).

#### Beispiel 10: Klonierung, rekombinante Produktion und Reinigung eines His-Galectin-10 Fusionsproteins

Das Galectin-10 Gen wurde aus humane Leukocyten Quick-Clone cDNA (BD Biosciences) amplifiziert. Das N-terminal His-tag Galectin-10 Konstrukt (pET16b) wurde in den Echerichia coli Stamm BL21(DE3) transfiziert und die Expression mit 1mM Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Sigma) induziert. Die Zellen produzierten das His-Galectin-10 Fusionsprotein in Gegenwart von 1M Sorbitol und 2.5mM Betain. Das rekombinante His-Galectin-10 Fusionsprotein wurde mit Hilfe einer Ni-NTA Affinitätschromatographie (Qiagen) gereinigt. Die Identität des gereinigten Proteins wurde mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie bestätigt.

#### Beispiel 11: Herstellung der siRNA und Nukleofektion

Zwei jeweils 19 Basenpaare (bp) lange Sequenzen wurden aus der Sequenz von Galectin-10 ausgewählt und synthetisiert, wobei zusätzlich ein 2bp Überhang synthetisiert wurde. Die dsRNA, die das größte Suppressionsvermögen bzgl. Der Galectin-10 mRNA Expression aufwies wurde ausgewählt:

Galectin-10-Sense: GGA GGA AUC AGA CAU UGU CdTdT;

Galectin-10-Antisense: GAC AAU GUC UGA UUC CUC CdTdT.

Die siRNA wurde in RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -80°C gelagert. Die Nukleofektion wurde nach einem für T-Zellen optimierten Protokoll der Firma Amaxa unter Verwendung des primary Human T Cell Nucleofector™ Kit (Amaxa) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden  $3 \times 10^6$  CD25+ T-Zellen in der Nucleofector™ Solution (Amaxa) suspendiert und mit siRNA in Konzentrationen von 0,5µM bis 1µM inkubiert. Direkt im Anschluss an die Nukleofektion wurden die Zellen in warmen X-VIVO-15 (Cambrex) resuspendiert.



### Beispiel 11: Quantifizierung von Galectin mRNA in T-Zellen mittels RT-PCR

Die Quantifizierung von humaner Galectin-10 mRNA erfolgte aus folgenden T-Zell-Populationen: CD4+ unstimuliert und polyklonal stimuliert mit anti-CD3/CD28 für 24 h, CD4+CD25+ $\beta$ 1+ unstimuliert und polyklonal stimuliert mit anti-CD3/CD28 für 24 h sowie CD4+CD25+ $\beta$ 7+ unstimuliert und polyklonal stimuliert mit anti-CD3/CD28 für 24 h. Die gesamte zelluläre RNA wurde aus  $1 \times 10^6$  Zellen unter Verwendung von TRIZOL (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) isoliert. Die entsprechende cDNA wurde mit RevertAid M-MuLV reverser Transkriptase nach Angaben des Herstellers synthetisiert (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die RT-PCR wurde unter Verwendung der folgenden Reaktionsmischung durchgeführt: 25  $\mu$ l Reaktionsmischung enthaltend 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,5  $\mu$ M forward und reverse Primer and 0,25 U von Biotherm DNA Polymerase (GeneCraft, Deutschland).

Folgendes PCR-Programm wurde angewendet: 94°C 2 min, und jeweils 35 Zyklen mit 94°C 30 s, bei 55 °C 30 s und 72 °C 1 min.

Um die Amplifizierung von genomischer DNA zu vermeiden, wurden folgende Primer designed, die über die Intron/Exon-Grenze der gesuchten cDNA hinüberreichen:

Galectin-10.forward: 5'-TAC CCG TGC CAT ACA CAG AGG CTG-3'  
Galectin-10.reverse: 5'-CTT ATC TGG CAG CAC TGA GAT GCT C-3'  
h $\beta$ -Aktin.forward: 5'-GAG CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3'  
h $\beta$ -Aktin.reverse: 5'-GAA GGT AGT TTC GTG GAT GGC-3'  
18S rRNA.forward: 5'-TCG ATG CTC TTA GCT GAG TGT CC-3'  
18S rRNA.reverse: 5'-TGA TCG TCT TCG AAC CTC CG-3'  
EF1- $\alpha$ .forward: 5'-GAT TAC AGG GAC ATC TCA GGC TG-3'  
EF1- $\alpha$ .reverse: 5'-TAT CTC TTC TGG CTG TAG GGT GG-3'  
FoxP3.forward: 5'-CTA CGC CAC GCT CAT CCG CTG G-3'

FoxP3.reverse: 5'-GTA GGG TTG GAA CAC CTG CTG GG-3'

Die Real Time Analyse von Galectin-10 mRNA wurde mit Hilfe des iCycler (Bio-Rad, München, Deutschland) unter Verwendung von IQ SYBRO Green Supermix (Bio-Rad) durchgeführt. Nach Normalisierung der Intensitäten auf die Expression von 18S rRNA wurden die relativen Expressionslevel von Galectin-10 mRNA berechnet.

#### Beispiel 12: Produktion eines monoklonalen anti-Galectin-10 Antiserums

Die Immunisierung von Kaninchen mit dem rekombinanten Galectin-10 erfolgte mit 50 µg Protein in Lösung. Diese Lösung wurde mit einem gleichen Volumen an Complete Freund's Adjuvant (CFA) emulgiert und intravenös an mehreren Stellen entlang des Rückens des Kaninchens injiziert. Weitere Boosterinjektionen von Galectin-10 in CFA wurden dreimal innerhalb von drei Wochen gegeben. Die Antikörperproduktion wurde durch ELISA und Westernblot-Analysen verfolgt. Nach drei finalen Blutungen wurde das IgG aus dem Antiserum nach einer Methode nach Harboe und Ingild (Harboe N und Ingild A. „Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre.“ Scand J Immunol Suppl. 1:161(1973)) isoliert.

#### Beispiel 13: Western Blot Analyse

Für die Western Blot Analysen nach 1D-PAGE wurden die Zellen in SDS-Puffer lysiert und die Proteinkonzentration mit einem DC Proteinassay (Bio Rad, München, Deutschland) analysiert. Als Standard wurde Serumalbumin eingesetzt. Die Proteine wurden in 5-10µg/ Tasche in 16% Tricin SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend auf Membranen transferiert. Unspezifische Bindungsstellen

wurden durch Roti-Block (Roth, Karlsruhe, Deutschland) abgesättigt. Für die Immundetektion wurden die Membranen jeweils 1 Stunde erst mit dem anti- Galectin-10 Antikörper und anschließend mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären anti-Kaninchen Antikörper inkubiert. Die Peroxidaseaktivität wurde durch eine Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, DakoCytomation, Copenhagen, Denmark) sichtbar gemacht.

Für Western Blot Analysen nach 2D-PAGE wurden 60 µg der löslichen Proteine aus den Gesamtzelllysaten in einem 2D Gel getrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Nach dem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit Roti-Block über Nacht wurden die Membranen 1 Stunde mit 2 µg anti-Galectin-10 Antikörper und anschließend für 1 Stunde mit einem alkalische Phosphatase-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert. Die Anfärbung erfolgte NBT/BCIP. Die detektierten Signale im 2D Western Blot wurden mit den silbergefärbten Proteinen der 2D-Gele zur Deckung gebracht.

#### Beispiel 14: Immunocytochemie

Cytozentrifugationspräparationen von Frisch isolierten CD4+ oder CD25+ T-Zellen wurden luftgetrocknet und bei -20°C bis zum Färben gelagert. Zum Färben wurden die Probenträger kurz aufgetaut und anschließend in 4% Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mit 0.2% Triton X-100 innerhalb von 5 Minuten permeabilisiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Cytospins mit einer Peroxidase blocking Lösung (DakoCytomation, Copenhagen, Denmark) für 5 Minuten inkubiert um endogene

Peroxidaseaktivität zu neutralisieren. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 20µg/ml Ziegen Serum (normal goat serum ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) abgesättigt. Die Immundetektion erfolgte durch Zugabe von 10µg/ml anti-Galectin-10 Antikörper oder als Kontrolle mit dem pre-Immuns Serum über Nacht bei 4°C. Die Cytospins wurden mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten anti-Kaninchen Antikörper aus Ziege (554021, BD Biosciences Pharmingen) inkubiert. Danach wurde den die Zellen intensiv mit PBS gewaschen und die Peroxidaseaktivität durch eine Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DakoCytomation, Kopenhagen, Dänemark) sichtbar gemacht.

#### Beispiel 15: Vergleichende Proteomstudie humaner CD25+ Tregs versus konventioneller CD4+ T-Zellen

Natürlich vorkommende CD25+ Tregs sind durch die einzigartigen Eigenschaften, die Aktivierung konventioneller CD4+ T-Zellen zu supprimieren charakterisiert. Bis jetzt ist allerdings nur wenig über die Proteine bekannt, die in diesen zellkontaktabhängigen Prozess involviert sind. Für die Identifizierung solcher Proteine, die in die Funktion der CD25+ Treg-Zellen involviert sind, wurde eine differenzielle Proteomanalyse von ruhenden und aktivierten konventionellen CD4+ T-Zellen im Vergleich zu ruhenden und aktivierten CD25+ Treg Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden bis zu  $10^8$  CD25+ Treg and CD4+ T-Zellen mit sehr hoher Reinheit aus buffy coats oder Leukapheresaten isoliert. Die T-Zellpräparationen wurden vor der Proteomanalyse hinsichtlich ihrer Funktionalität charakterisiert. Die ruhenden Zellen wurden direkt nach der Isolierung mittels 2D-PAGE analysiert, während die aktivierten Zellen für 48 Stunden polyklonal aktiviert wurden.

Die für die Proteomstudie eingesetzten 2D-Gele deckten

einen pI-Bereich von 4 bis 10 und einen Molekulargewichtsbereich von 6 bis 150 kDa ab.

Ca. 1600 Proteinspots wurden beim Vergleich der Gele in allen Gelen detektiert und gematched. Die Gele einer Probe wurden als Dreifachbestimmung angefertigt, wobei sich die Proteinspotmuster nicht nur innerhalb einer Probe sehr ähnelten, sondern auch bei dem Vergleich der unterschiedlichen T-Zellpopulationen und auch der untersuchten individuellen humanen Spendern. Der größte Anteil (>90%) aller darstellbaren Proteinspots zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit sowohl in der relativen Lage im 2D-Gel als auch in der Spotintensität. Die Galectin-10 Isoformen 1 bis 3 weisen mit einer Intensitätserhöhung um Faktor 10 bis 40 die größten Unterschiede im Vergleich auf.

Die Expression von Galectin-10 ist bislang nur in Granulozyten beschrieben (Golightly, L. M., Thomas, L. L., Dvorak, A. M. and Ackerman, S. J. "Charcot-Leyden crystal protein in the degranulation and recovery of activated basophils" J. Leukoc. Biol. 51, 386-392 (1992); Dvorak, A. M., Letourneau, L., Weller, P. F. and Ackerman, S. J. "Ultrastructural localization of Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to intracytoplasmic crystals in tumor cells of primary solid and papillary epithelial neoplasm of the pancreas" Lab. Invest. 62, 608-615 (1990); Dvorak, A. M. and Ackerman, S. J. "Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to granules and intragranular crystals in mature human basophils" Lab. Invest. 60, 557-567 (1989)).

Beispiel 16: Nachweis der Expression von Galectin-10 mRNA in humanen CD25+ Treg Subsets

Die Ergebnisse der Proteomanalyse humaner T-Zellen haben

gezeigt, dass Galectin-10 Protein am stärksten durch CD25+ Tregs produziert wird. Diese Resultate wurden mittels konventioneller RT-PCR und real-time PCR auf mRNA-Ebene weiter analysiert. Im Gegensatz zu den Proteindaten der Proteomstudie wurde selbst nach 30 RT-PCR-Zyklen keine Galectin-10 mRNA in konventionellen CD4+ T-Zellen nachgewiesen. (Figur. 6A). Unter denselben Bedingungen wurde jedoch in frisch isolierten CD25+ Tregs ein sehr starkes Signal für Galectin-10 mRNA detektiert.

In weiteren Analysen wurde der Gehalt an Galectin-10 mRNA in konventionellen CD4+ T-Zellen und CD25+ Treg Zellen durch quantitative real-time PCR untersucht. Frisch isolierte CD4+ T-Zellen exprimieren sehr geringe Mengen an Galectin-10 mRNA während frisch isolierte CD25+ Treg Zellen große Mengen an Galectin-10 mRNA exprimieren. In beiden Zellpopulationen nehmen die mRNA Level nach einer polyclonalen Aktivierung ab. Bei CD4+ T-Zellen ist 48 Stunden nach der Aktivierung keine Galectin-10 mRNA mehr nachweisbar.

Beispiel 17: Western Blot Analyse von Galectin-10 in Zelllysaten ruhender und aktivierter humaner CD4+ T-Zellen sowie CD25+ Treg Zellen

Um die Daten der Proteomanalyse mit Western Blot Analysen zu verifizieren wurde rekombinantes Galectin-10 hergestellt und daraus ein polyklonales Antiserum generiert. Die IgG Fraktion des hergestellten Antiserums wurde für die Detektion von Galectin-10 in Lysaten von ruhenden sowie aktivierten konventionellen humanen CD4+ T-Zellen und CD25+ Treg Zellen eingesetzt. Die Proteine der Lysate wurden zuvor mittels eindimensionaler oder zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. In Figur 7 ist gezeigt, dass in Lysaten konventioneller CD4+ T-Zellen Galectin-10 kaum detektierbar ist während in den Lysaten aus CD25+ Treg

Zellen eine starke Färbung zu erkennen ist. Als Positivkontrolle diente hier das rekombinante Galectin-10. Der in Figur 7 dargestellte Western Blot gibt ein repräsentatives Ergebnis aus sieben unabhängigen Experimenten von Zellen unabhängiger gesunder Spender wieder. Zusätzlich zeigt dieses Ergebnis, dass der hergestellte Antikörper gegen das rekombinat hergestellte Galectin-10 auch das natürliche Galectin-10 Protein erkennt. In den Proteomanalysen wurden drei unterschiedliche Isoformen des Galectin-10 Proteins detektiert und massenspektrometrisch identifiziert. In Western Blot-Analysen nach Auftrennung der Proteine aus dem Lysat humaner CD25+ Treg Zellen wurde gezeigt, dass der Antikörper alle drei Isoformen des Proteins anfärbt. Zusätzlich wurden noch weitere sehr schwache Signale für zwei (vier) weitere Isoformen des Proteins erhalten. Diese Signale konnten mit den silbergefärbten 2D-Gelen zur Deckung gebracht werden (Fig. 3B).

Beispiel 18: Färbung konventioneller CD4+ T-Zellen und CD25+ Treg Zellen mit dem rabbit anti-galectin-10 IgG

Die Tatsache, dass das Protein Galectin-10 fast ausschließlich in CD25+ regulatorischen T-Zellen detektiert wird zeigt sein Potential als Marker für diese Zellen, um zwischen konventionellen CD4+ T-Zellen und CD25+ regulatorischen Zellen zu unterscheiden. Um dies zu zeigen, wurden Cytospinpräparationen von beiden T-Zellpopulationen, die aus demselben Spender isoliert wurden angefärbt. Figur 8. zeigt, dass unter den frisch isolierten konventionellen CD4+ T-Zellen nur ein geringer Anteil von weniger als 1% angefärbt wurde. Dieser geringe Anteil ist wahrscheinlich in einer geringen Kontamination durch CD25+ T-Zellen begründet. In der Population der CD25+ regulatorischen T-Zellen zeigten 20-30% eine starke Färbung während sich die

anderen Zellen nicht anfärbten. Dies Ergebnis zeigt, dass die CD4+CD25+ T-Zellen, die mit antikörpergeköpkelten magnetischen Beads aus dem peripheren Blut isoliert werden, nicht eine homogene Zellpopulation sind, sondern sich aus aktivierten konventionellen CD4+CD25+ T-Zellen und CD25+ regulatorischen T-Zellen zusammensetzen. Durch die Färbung der Zellen lassen sich auch Angaben zur subzellulären Lokalisation von Galectin-10 in regulatorischen T-Zellen machen. In den wenigen positiv angefärbten Zellen der Population der konventionellen CD4+ T-Zellen lag Galectin-10 gleichmäßig in der Zelle verteilt vor während in den CD25+ regulatorischen T-Zellen eine Anreicherung von Galectin-10 an der Plasmamembran zu erkennen war. Basierend auf dem unterschiedlichen Färbeverhalten (Vorkommens von Galectin-10) kann durch eine Anfärbung mit Antikörpern oder Bindern gegen Galectin-10 zwischen konventionellen CD4+ T-Zellen und CD25+ regulatorischen T-Zellen unterschieden werden.

#### Beispiel 19: Funktionelle Eigenschaften von Galectin-10 in humanen CD25+ regulatorischen T-Zellen

Eine Inhibierung der Galectin-10 Expression durch siRNA hebt den anergen Zustand dieser Zellen auf und verringert dasSuppressionsvermögen. Mit einer geeigneten siRNA wurde eine Inhibierung der Galectin-10 Expression bewirkt, um die Funktion dieses Proteins innerhalb der CD25+ regulatorischen T-Zellen näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden CD25+ regulatorische T-Zellen mit mittels Nukleofektion mit Galectin-10 siRNA transfiziert und die Expressionsrate von Galectin-10 mRNA quantifiziert. 48 Stunden nach der Transfektion war der Galectin-10 mRNA-Gehalt am stärksten reduziert. Fig. 9 zeigt die durch Galectin-10 siRNA reduzierte Expression der Galectin-10 mRNA. Bei 0,5 µM Galectin-10 siRNA reduziert sich die



Galectin-10 mRNA auf 27% des Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle und bei 1,0  $\mu$ M Galectin-10 siRNA reduziert sich die Galectin-10 mRNA auf 11% des Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle (SC = scrambled control: 0,5  $\mu$ M und 1,0  $\mu$ M). Die mit siRNA transfizierten CD25+ T-Zellen wurden nach dem Erreichen einer maximalen Suppression von Galectin-10 mRNA polyklonal mit anti-CD3 und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern für 48 Stunden aktiviert. Die Proliferation dieser Zellen wurde über einen Zeitraum von weiteren 96 Stunden durch die Aufnahme von radioaktiv markiertem Thymidin verfolgt. Die Proliferation der mit siRNA transfizierten Zellen war deutlich höher als bei den entsprechenden Kontrollzellen (scrambled controls SC: 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M). und erreichte eine Proliferation, die der von konventionellen CD4+ T-Zellen entspricht (Figur 9) Die Proliferation von konventionellen CD4+ T-Zellen, die analog mit der Galectin-10 siRNA transfiziert wurden, zeigte keine Veränderung. Mit diesen Ergebnissen wird gezeigt, dass Galectin-10 eine entscheidende Funktion bei der Aufrechterhaltung des anergen Zustandes der CD25+ regulatorischen T-Zellen hat.

Um den Einfluss von Galectin-10 auf die Suppressionseigenschaften der CD25+ regulatorischen T-Zellen zu untersuchen, CD25+ regulatorische T-Zellen nach Transfektion mit Galectin-10 siRNA mit konventionellen CD4+ T-Zellen kokultiviert. Hierbei wurde die Proliferation der konventionellen CD4+ T-Zellen nicht verändert. Dies bedeutet, dass das Vorhandensein von Galectin-10 Protein in den CD25+ regulatorischen T-Zellen für die suppressiven Eigenschaften der Zellen essenziell ist.

#### Beispiel 20: Kryokonservierung von T-Zellen

Für die Kryokonservierung von T-Zellen wurde ein Zellpellet in 50  $\mu$ l Tissue-Tek (Miles Diagnostic, Elkhart USA)

aufgenommen und durch vorsichtiges Rühren in Suspension gebracht. Diese Zellsuspension wurde tropfenweise in flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Ein gefrorener Tropfen wurde in eine Kryoplastikform überführt und mit Tissue-Tek aufgefüllt und erneut in flüssigem Stickstoff gefroren.

Die Schnitte wurden mit einer Schichtdicke von 3 µm angefertigt und die Schnitte anschließend über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Das Anfärben von Kryoschnitten mit Antikörpern erfolgte analog zu den Cytospinpräparationen.

Erläuterung der Sequenzen:

SEQ ID No. 1, Human Charcot-Leyden Crystal Protein (Galectin 10):

1HDK

A Chain A, Charcot-Leyden Crystal Protein - Pcmb Complex

ACCESSION 1HDK; gi|17942629

Organismus: Homo sapiens

SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFR  
RVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKPE  
AVKMQVWRDISLTKFNVSYLKR

SEQ ID No. 2:

Q05315

Eosinophil lysophospholipase (Charcot-Leyden crystal protein). (Lysolecithin acylhydrolase) (CLC) (Galectin-10).

ACCESSION: Q05315; gi|547870

Organismus: Homo sapiens

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLTKFNVSYLKR

SEQ ID No. 3, Maus Charcot-Leyden crystal protein homolog:  
P97400

Eosinophil lysophospholipase (Charcot-Leyden crystal  
protein homolog) (Lysolecithin acylhydrolase) (CLC)  
(Galectin-10).

ACCESSION: P97400; gi|2829838

Organismus: Mus musculus

oder

AAB41694

Charcot-Leyden crystal protein ortholog

ACCESSION: AAB41694; gi|1813526

Organismus: Mus musculus

EPYLQVDFHTEMKEDSDIAFHSRVYFGHWVMNSRVNGAWQYEVTCHNMPFQDGKPFNL  
SISVPPDKY

SEQ ID No. 4, Human Galectin-1:

NP\_002296

beta-galactosidase binding lectin precursor; Lectin,  
galactose-binding, soluble, 1; galectin

Organismus: Homo sapiens

ACCESSION NP\_002296 ; gi|4504981

MACGLVASNLNLKPGECLRVGEVAPDAKSFVLNLGKDSNNLCLHFNPRFNAHGDANTI  
VCNSKDGGAWGTEQREAVFPFQPGSVAEVCITFDQANLTVKLPGDYEFKFPNRLNLEAI  
NYMAADGDFKIKCVAFD

SEQ ID No. 5, Maus Galectin-1:

P16045

Galectin-1 (Beta-galactoside-binding lectin L-14-  
I) (Lactose-binding lectin 1) (S-Lac lectin 1) (Galaptin)  
(14 kDa lectin)

ACCESSION: P16045, gi|126172

MACGLVASNLNLKPGECLKVRGEVASDAKSFVLNLGKDSNNLCLHFNPRFNAHGDA NTI  
VCNTKEDGTWGT EHPAPFPQPGSITEVCITFDQADLT IKLPDGHEFKFPNRLNMEAI  
NYMAADGDFKIKCVA FE

SEQ ID No. 6, Nukleinsäure kodierend für eine  
Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2  
(Galectin 10):

CAATTCAGAAGAGCCACCCAGAAGGAGACAACAATGTCCCTGCTACCCGTGCCATACAC  
AGAGGCTGCCTCTTTGTCTACTGGTTCTACTGTGACAATCAAAGGGCGACCACTTGTCT  
GTTTCTTGAATGAACCATATCTGCAGGTGGATTTCCACACTGAGATGAAGGAGGAATCA  
GACATTGTCTTCCATTTCCAAGTGTGCTTTGGTCTGTCGTGTGGTCATGAACAGCCGTGA  
GTATGGGGCCTGGAAGCAGCAGGTGGAATCCAAGAACATGCCCTTTCAGGATGGCCAAG  
AATTTGAACTGAGCATCTCAGTGCTGCCAGATAAGTACCAGGTAATGGTCAATGGCCAA  
TCCTCTTACACCTTTGACCATAGAATCAAGCCTGAGGCTGTGAAGATGGTGCAAGTGTG  
GAGAGATATCTCCCTGACCAAATTTAATGTCAGCTATTTAAAGAGATAACCAGACTTCA  
TGTTGCCAAGGAATCCCTGTCTCTACGTGAACTTGGGATTCCAAAGCCAGCTAACAGCA  
TGATCTTTTCTCACTTCAATCCTTACTCCTGCTCATTA AAACTTAATCAA ACTTCAAAA  
AAAAAAA

SEQ ID No. 7, Nukleinsäure kodierend für eine  
Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 4 (Galectin 1):

ATCTCTCTCGGGTGGAGTCCTTCTGACAGCTGGTGCGCCTGCCCGGGAACATCCTCCTG  
GACTCAATCATGGCTTGTGGTCTGGTCGCCAGCAACCTGAATCTCAAACCTGGAGAGTG  
CCTTCGAGTGCGAGGCGAGGTGGCTCCTGACGCTAAGAGCTTCGTGCTGAACCTGGGCA  
AAGACAGCAACAACCTGTGCCTGCACTTCAACCCTCGCTTCAACGCCCACGGCGACGCC  
AACACCATCGTGTGCAACAGCAAGGACGGCGGGGCCTGGGGGACCGAGCAGCGGGAGGC  
TGTCTTTCCCTTCCAGCCTGGAAGTGTTGCAGAGGTGTGCATCACCTTCGACCAGGCCA  
ACCTGACCGTCAAGCTGCCAGATGGATACGAATTCAAGTTCCCCAACCGCCTCAACCTG  
GAGGCCATCAACTACATGGCAGCTGACGGTGACTTCAAGATCAAATGTGTGGCCTTTGA  
CTGAAATCAGCCAGCCCATGGCCCCCAATAAAGGCAGCTGCCTCTGCTCCCCTG

SEQ ID No. 8

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLTKFNVSYLK

SEQ ID No. 9

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLTKFNVSYL

SEQ ID No. 10

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLTKFNVS

SEQ ID No. 11

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLTKFNVS

SEQ ID No. 12

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLTKFN

SEQ ID No. 13

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLTKFN

SEQ ID No. 14

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLTKF

SEQ ID No. 15

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLTK

SEQ ID No. 16

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISLT

SEQ ID No. 17

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDISL

SEQ ID No. 18

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDIS

SEQ ID No. 19

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRDI

SEQ ID No. 20

MSLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMQVWRD

SEQ ID No. 21

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMOVWR

SEQ ID No. 22

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMOVWR

SEQ ID No. 23

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMOVW

SEQ ID No. 24

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMOV

SEQ ID No. 25

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMOV

SEQ ID No. 26

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKMV

SEQ ID No. 27

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVKM

SEQ ID No. 28

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAVK

SEQ ID No. 29

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EAV

SEQ ID No. 30

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
EA

SEQ ID No. 32

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP  
E

SEQ ID No. 33

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIKP

SEQ ID No. 34

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIK

SEQ ID No. 35

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVCFG  
RRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI

SEQ ID No. 36



Ac-SLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDQGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI

SEQ ID No. 37

Ac-SLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDQGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMQVWRDISLTKFNVSYLK

SEQ ID No. 38

Ac-SLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDQGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMQVWRDISLTKFNVSYL

SEQ ID No. 39

Ac-SLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDQGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMQVWRDISLTKFNVS

SEQ ID No. 40

Ac-SLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDQGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMQVWRDISLTKFNVS

SEQ ID No. 41

Ac-SLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDQGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMQVWRDISLTKFN

SEQ ID No. 42

Ac-SLLPVPHYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDQGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMQVWRDISLTKFN

SEQ ID No. 43

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVWRDISLTKF

SEQ ID No. 44

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVWRDISLTK

SEQ ID No. 45

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVWRDISLT

SEQ ID No. 46

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVWRDISL

SEQ ID No. 47

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVWRDIS

SEQ ID No. 48

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVWRDI

SEQ ID No. 49

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVWRD

SEQ ID No. 50

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVWR

SEQ ID No. 51

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVWR

SEQ ID No. 52

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOVW

SEQ ID No. 53

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOV

SEQ ID No. 54

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMOV

SEQ ID No. 55

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKMV

SEQ ID No. 56

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVKM

SEQ ID No. 57

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAVK

SEQ ID No. 58

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEAV

SEQ ID No. 59

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPEA

SEQ ID No. 60

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KPE

SEQ ID No. 61

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
KP

SEQ ID No. 62

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI  
K

SEQ ID No. 63

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRI

SEQ ID No. 64

Ac-SLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVFHFQVC  
FGRRVVMNSREYGAWKQQVESKNMPFQDGQEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHR

Erläuterung der Figuren:

Figur 1

Änderung der Proteinkonzentration von Charcot-Leyden Crystal Protein Isoform 1 (Spot 68) bei dem Vergleich humaner regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+ und CD4+CD25+ $\beta$ 7+) mit konventionellen T-Zellen (CD4+) nach polyklonaler Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Die Pfeile zeigen die differenziellen Proteinspots.

Figur 2

Änderung der Proteinkonzentrationen von Charcot-Leyden Crystal Protein Isoform 2 (Spot 33) und Isoform 3 (Spot 34) bei dem Vergleich humaner regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+ und CD4+CD25+ $\beta$ 7+) mit konventionellen T-Zellen (CD4+) nach polyklonaler Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Die Pfeile zeigen die differenziellen Proteinspots.

Figur 3

Änderung der Proteinkonzentration von Charcot-Leyden Crystal Protein Isoform 1 (Spot 68) bei dem Vergleich von

stimulierten versus nicht stimulierten humanen regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+ und CD4+CD25+ $\beta$ 7+) und konventionellen T-Zellen (CD4+). Die Pfeile zeigen die differenziellen Proteinspots.

Figur 4

Änderung der Proteinkonzentration von Galectin 1 im Vergleich humaner regulatorischer T-Zellen (CD4+CD25+ und CD4+CD25+ $\beta$ 7+) mit konventionellen T-Zellen (CD4+) nach polyklonaler Stimulierung mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern. Die Pfeile zeigen die differenziellen Proteinspots.

Figur 5:

Quantifizierung von Spotintensitäten von Galectin-10 (Spot 68) nach Trennung der Gesamtllysate von ruhenden und 48 h aktivierten konventionellen T-Zellen und Treg. Die Spotintensitäten wurden mit Hilfe der Proteomweaver Bildauswertungssoftware ermittelt und jeweils auf die Spotintensität in aktivierten Cd4+ konventionellen T-Zellen normailisiert (Relative Intensität = 1). Sowohl in ruhenden als auch in aktivierten CD4+CD25+ Treg wurden ca. 40-fach höhere Intensitäten ermittelt als in konventionellen T-Zellen.

Figur 6:

Galectin-10 mRNA Expression in CD25+ Tregs

A: RT PCR Analyse der Galectin-10 mRNA und  $\beta$ -Aktin mRNA aus frisch isolierten sowie aktivierten konventionellen CD4+ T-Zellen und CD25+ Tregs.

B: Quantifizierung der relativen Galectin-10 mRNA in CD4+ T-Zellen und CD25+ Tregs. cDNA Proben wurden mittels quantitativer real-time PCR unter Verwendung spezifischer Primer für Galectin-10 oder EF1- $\alpha$ . analysiert Der relative

Gehalt der Galectin-10 mRNA in jeder Probe wurde auf den Gehalt von EF1- $\alpha$  mRNA normalisiert.

C: Quantifizierung des relativen Gehalts an FoxP3 mRNA in CD4+ T-Zellen und CD25+ Tregs. cDNA Proben wurden mittels quantitativer real-time PCR unter Verwendung spezifischer Primer für FoxP3 oder EF1- $\alpha$ . analysiert Der relative Gehalt der FoxP3 mRNA in jeder Probe wurde auf den Gehalt von EF1- $\alpha$  mRNA normalisiert.

(activated = 24 Stunden mit anti-CD3 [0.5 $\mu$ g/ml], anti-CD28 mAb [1 $\mu$ g/ml] aktiviert).

Figur 7: Western Blot Analyse der Galectin-10 Produktion in CD25+ Tregs und konventionellen CD4+ T-Zellen

A 1D PAGE: Frisch isolierte (T = 0 Stunden) und aktivierte T-Zellen (1 $\mu$ g/ml monoklonaler anti-CD3 and 2 $\mu$ g/ml monoklonaler anti-CD28 Antikörper für die angegebene Zeitdauer) wurden lysiert und 5 $\mu$ g des Gesamtproteinextraktes mittels 1D-PAGE aufgetrennt. Die auf einer Membran immobilisierten Proteine wurden mit 0,5 $\mu$ g anti-galectin-10 IgG inkubiert. Der Blot wurde mit einem Meerrettichperoxidase konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper unter Verwendung des ECL Substrates mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

B 2D PAGE: Western Blot Analyse nach 2D PAGE der Galectin-10 Isoformen. Das Gesamtzelllysat isolierter und für 48 Stunden mit 1 $\mu$ g/ml monoklonalen anti-CD3 und 2 $\mu$ g/ml monoklonalen anti-CD28 Antikörpern aktivierten CD25+ Tregs wurde im 2D Gel aufgetrennt. Der Immunoblot wurde analog zu dem nach eindimensionaler Trennung angefertigten durchgeführt, jedoch wurde für die Visualisierung der Isoformen ein Alkalische Phosphatase-konjugierter sekundärer anti-Kaninchen-Antikörper und BCIP/NBT als Substrate verwendet. Die Signale des 2D-Gel Western Blots wurden mit einem silbergefärbten 2D-Gel derselben T-Zellen

zur Deckung gebracht. Alle drei zuvor als Galectin-10 identifizierten Proteine wurden mit den Signalen des Western-Blots zur Deckung gebracht.

Figur 8: Färbung konventioneller CD4+ T-Zellen und CD25+ Tregs mit polyklonalem anti-Galectin-10 Antibody

Kryoschnittpräparationen aktivierter konventioneller CD4+ T-Zellen und CD25+ Treg Zellen. Die so präparierten Zellen wurden in einem Kontrollansatz mit anti-CD3 Antikörpern angefärbt. Dieses Oberflächenprotein wird sowohl auf konventionellen CD4+ T-Zellen als auch auf Treg-Zellen exprimiert. In den Kryoschnitten wurden beiden Zellpopulationen positiv angefärbt. Als Negativkontrolle diente hier der Sekundärantikörper anti-Kaninichen IgG. Galectin-10 wurde mit dem anti-Galectin-10 Antiserum angefärbt. Hierbei wurde deutlich gezeigt, dass Galectin-10 nur in Treg Zellen nachweisbar ist. Die konventionellen T-Zellen zeigten keine positive Färbung. Als Negativkontrolle diente hier das Präimmunserum.

Figur 9: Galectin-10 Gen knock-out durchbricht die Anergie humaner CD25+ Tregs

A Galectin-10 Expression: Frisch isolierte CD25+ Tregs wurden mit 0,5  $\mu$ M oder 1 $\mu$ M gegen Galectin-10 gerichtete siRNA oder 1 $\mu$ M Kontroll-siRNA (scrambled control: SC) transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die RNA isoliert und für realtime PCR Analysen verwendet. Die Menge der Galectin-10 mRNA wurde quantifiziert und normalisiert auf die mRNA Menge des Haushaltsgens EF1- $\alpha$  (NF=nucleofected ohne siRNA).

B Proliferation: 48 Stunden nach der Transfektion wurden die T-Zellen mit monoklonalen anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern (1 $\mu$ g/ml + 2 $\mu$ g/ml) stimuliert. Die Proliferation



der T-Zellen wurde nach weiteren vier Tagen durch die Zugabe von 37 kBq/Kavität 3H-Tdr für weitere 16 Stunden gemessen.

C Suppression: Die suppressiven Eigenschaften der Treg auf konventionelle T-Zellen nach Transfektion der Treg mit Galectin-10 siRNA wurde durch Messung der Proliferation der konventionellen T-Zellen bestimmt. Hierzu wurden beide Zelltypen in Kokultur kultiviert. Die Proliferation der Treg-Population wurde zuvor durch radiative Bestrahlung inhibiert. Kokulturexperimente zeigten deutlich eine Abnahme der suppressiven Eigenschaften der Treg nach einer Inhibierung der Galectin-10 Transkription und somit der Proteinproduktion durch siRNA.

Figur 10: Reinheitskontrolle des rekombinant hergestellten humanen Galectin-10 und der Selektivität des hergestellten polyklonalen anti-Galectin-10 Antiserums.

Nach Entfernung proteolytischer Abspaltung des His-tags von His-Galectin-10 durch Factor Xa wurde die Protease (Factor Xa) mit Hilfe einer Banzamidinsäule entfernt. Der abgespaltene wurde über Ni-NTA Affinitätschromatographie entfernt. Das so gereinigte Protein wurde mittels 1D PAGE getrennt und mit Coomassie visualisiert. Die Selektivität des Antiserums wurde nach analoger Trennung des rekombinanten Proteins im Western Blot bestätigt.

## Patentansprüche

1. Isolierte regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zelle enthaltend mindestens ein Galectin.
2. Isolierte T-regulatorische Zelle nach Anspruch 1, bestehend aus der Subpopulation CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>β7<sup>+</sup>.
3. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 oder 2, enthaltend mindestens ein Galectin ausgewählt aus der Gruppe Galectin 1-14.
4. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, enthaltend ein humanes Galectin oder ein homologes Protein.
5. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, enthaltend mindestens ein Galectin ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 5.
6. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, enthaltend mindestens ein Galectin ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 mit den Isoformen: a.) apparentes Molekulargewicht von 14 kDa und einen pI von 6,7, b.) apparentes Molekulargewicht von 13,5 kDa und einen pI von 5,9, c.) apparentes Molekulargewicht von 13 kDa und einen pI von 5,9.
7. Isolierte T-regulatorische Zelle nach Anspruch 6, wobei die Isoformen ausgewählt sind aus der Gruppe SEQ ID No. 8 bis SEQ ID No. 64.

8. Isolierte regulatorische T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Galectin sekretiert, membranständig oder auf der Oberfläche der T-regulatorischen Zelle oder im Cytosol präsentiert ist.
9. Isolierte regulatorische T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Galectin in der regulatorischen T-Zelle oder auf der Oberfläche der regulatorischen T-Zelle angereichert ist.
10. Isolierte regulatorische T-Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Nukleinsäure kodierend für mindestens ein Galectin enthaltend ist und ggfs. eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen und/oder eine Poly(A)-Sequenz und/oder Erkennungssequenzen und/oder regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen umfasst.
11. Isolierte T-regulatorische Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus SEQ ID No. 6 oder SEQ ID No. 7.
12. Isolierte oder native regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zelle enthaltend mindestens ein Galectin als Target oder Marker.
13. Binder an mindestens einer isolierten regulatorischen T-Zelle nach einem der Ansprüche 1-11 oder nativen regulatorische T-Zelle nach Anspruch 12.

14. Binder nach Anspruch 13, ausgewählt aus der Gruppe Inhibitor, Agonist, Antagonist, Sonde, Antikörper oder Immunmodulator.
15. Binder nach einem der Ansprüche 13 oder 14, wobei der Binder ein oder mehrere Epitope gegen Galectin aufweist.
16. Binder nach Anspruch 15, wobei der Binder zusätzlich ein oder mehrere Epitope gegen ein Oberflächenprotein aufweist.
17. Binder nach Anspruch 16, wobei das Oberflächenprotein ausgewählt ist aus der Gruppe CD25, CD44, CD45, GITR, CTLA-4, Fox P3.
18. Binder nach einem der Ansprüche 13 bis 17, wobei die isolierte regulatorische T-Zelle oder native regulatorische T-Zelle enthaltend mindestens ein Galectin aktiviert oder deaktiviert wird.
19. Arzneimittel enthaltend mindestens einen Binder nach einem der Ansprüche 13 bis 18 oder isolierte T-regulatorischen Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
20. Arzneimittel nach Anspruch 19 zur Behandlung und Therapie von Erkrankungen und zwar von Allergien, Autoimmunerkrankungen, insbesondere Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn, Chronischer Inflammation, Asthma, Immundefizienz-Erkrankungen, AIDS, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen sowie Diabetes.
21. Arzneimittel nach Anspruch 20, wobei die

Autoimmunerkrankungen ausgewählt ist aus der Gruppe: Alopecia Areata, Morbus Bechterew, Antiphospholipid-Syndrom, Morbus Addison, Morbus Behcet, Zöliakie Sprue, chronische Müdigkeitssyndrom (Chronic Fatigue Immune Dysfunction Syndrome (CFIDS)), Polyneuropathie, Churg-Strauss Syndrom (Granulomatose), CREST-Syndrom (Raynaud-Syndrom), Cold Agglutinin Disease, Kryoglobulinämie, Fibromyalgie, Fibromyositis, Morbus Basedow, Guillain-Barré-Syndrom, idiopathische pulmonäre Fibrose; idiopathische Thrombozytopenie, IgA Nephropathie, Lichen Planus, Morbus Ménière, Polyarteritis Nodosa, Polychondritis, Polyglandular-Syndrom, Polymyalgia Rheumatica, Primary Agammaglobulinemie, Biliäre Cirrhose, Psoriasis, Morbus Reiter, Sarkoidose, Morbus Sjögren, Takayasu-Arteritis, Vasculitis, Vitiligo, Wegeners Granulomatose.

22. Testsystem enthaltend zumindest einen Binder und mindestens eine regulatorische T-Zelle enthaltend Galectine, zur Identifikation geeigneter Binder oder regulatorischen T-Zellen, vorzugsweise solche mit erhöhten supprimierenden Eigenschaften.
23. Testsystem umfassend mindestens eine regulatorische T-Zelle enthaltend Galectine und mindestens eine Zielzelle, insbesondere T-Zelle, B-Zelle, Makrophage, Prädendritische Zelle, Dendritische Zelle, embryonale Zelle und / oder Fibroblast, die mit mindestens einer regulatorische T-Zelle inkubiert werden zum in-vitro Nachweis supprimierender Eigenschaften, insbesondere zellulärer Immunantwort von Effektorzellen des Immunsystems, insbesondere B-Zellen, NK-Zellen, vorzugsweise T-Zellen, T-Helferzellen.

24. Testsystem nach Anspruch 23, wobei die Effektorzellen Säugerzellen sind, insbesondere humane oder murine Zellen oder Immunzelllinie und / oder kultivierte primäre Immunzelle.
25. Testsystem nach Anspruch 23 oder 24, wobei mindestens eine weitere Substanz inkubiert wird, die eine Immunantwort auslösen können, wie Proteine, Epitope, Proteinfragmente, Antigene oder Binder.
26. Diagnostikum enthaltend ein Testsystem nach einem der Ansprüche 22 bis 25 und gegebenenfalls einen pharmazeutischen akzeptablen Träger.
27. Diagnostikum nach Anspruch 26 zur Diagnose von Krankheiten und zwar von Allergien, Autoimmunerkrankungen, insbesondere Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Morbus Crohn, Chronischer Inflammation, Asthma, Immundefizienz-Erkrankungen, AIDS, Transplantatabstoßung und Krebserkrankungen sowie Diabetes.
28. Diagnostikum nach Anspruch 27 zur Diagnose von Krankheiten und zwar von Autoimmunerkrankungen ausgewählt aus der Gruppe Alopecia Areata, Morbus Bechterew, Antiphospholipid-Syndrom, Morbus Addison, Morbus Behcet, Zöliakie Sprue, chronische Müdigkeitssyndrom (Chronic Fatigue Immune Dysfunction Syndrome (CFIDS)), Polyneuropathie, Churg-Strauss Syndrom (Granulomatose), CREST-Syndrom (Raynaud-Syndrom), Cold Agglutinin Disease, Kryoglobulinämie, Fibromyalgie, Fibromyositis, Morbus Basedow, Guillain-Barré-Syndrom, idiopathische pulmonäre Fibrose, idiopathische Thrombozytopenie, IgA Nephropathie, Lichen Planus, Morbus Ménière, Polyarteritis Nodosa,

Polychondritis, Polyglandular-Syndrom, Polymyalgia Rheumatica, Primary Agammaglobulinemie, Biliäre Cirrhose, Psoriasis, Morbus Reiter, Sarkoidose, Morbus Sjögren, Takayasu-Arteritis, Vasculitis, Vitiligo, Wegeners Granulomatose.

Fig. 1/10

## Vergleich der stimulierten Zellpopulationen

Charcot-Leyden Crystal Protein Ac: gi|17942629

Isoform 1: Spot Nr. 8 bzw. 68

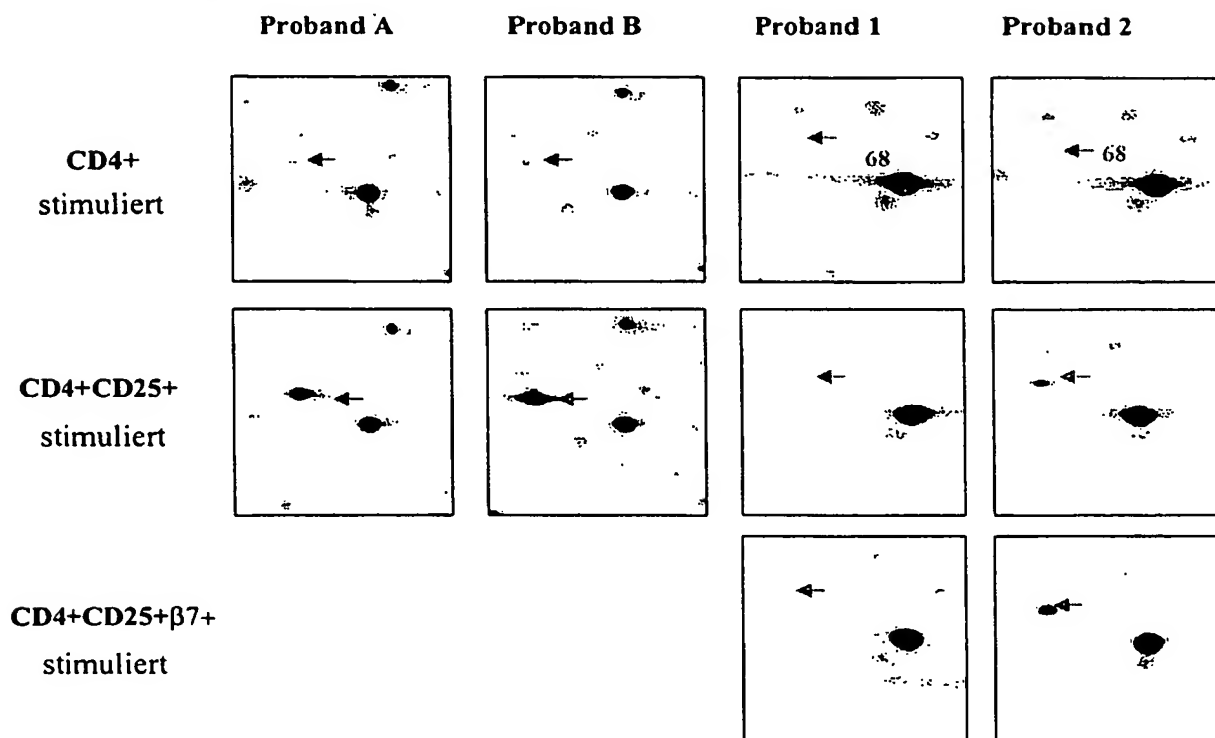




Fig. 2/10

## Vergleich der stimulierten Zellpopulationen

Charcot-Leyden Crystal Protein Ac: gi|17942629

Isoform 2 und 3: Spot Nr. 1, 2 bzw. 32, 33

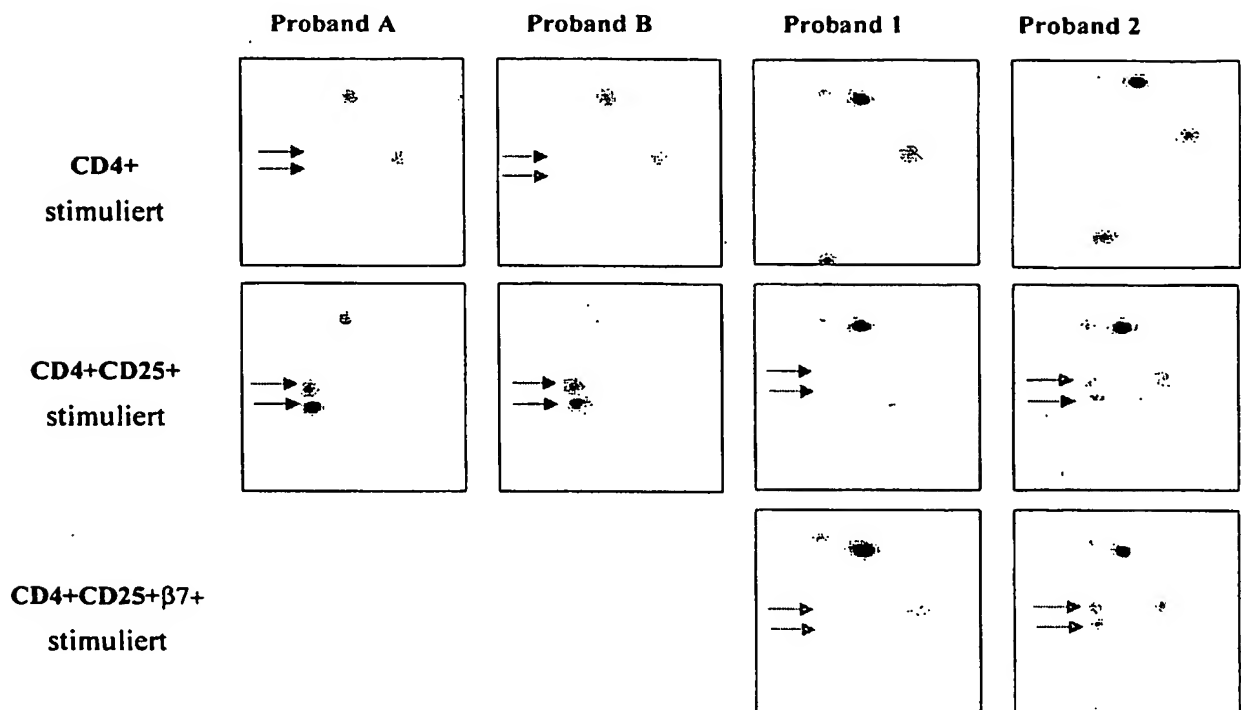
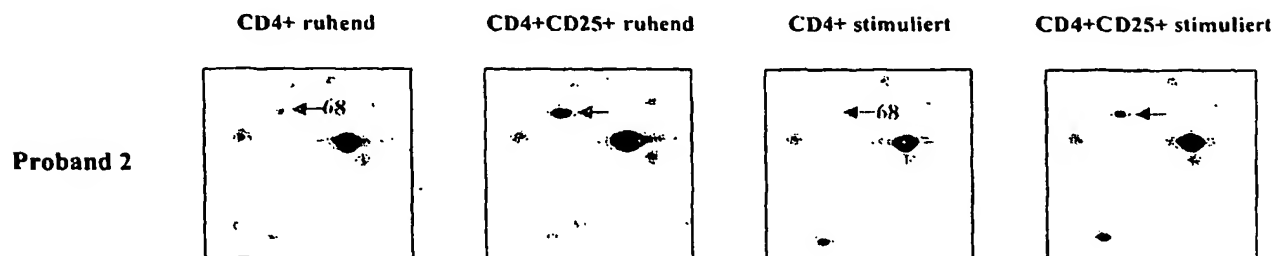


Fig. 3/10

## Vergleich der stimulierten und nicht-stimulierten Zellpopulationen

Charcot-Leyden Crystal Protein Ac: gi|17942629

Isoform 1: Spot Nr. 8 bzw. 68



Charcot-Leyden Crystal Protein Ac: gi|17942629

Isoform 2 und 3: Spot Nr. 1, 2 bzw. 32, 33

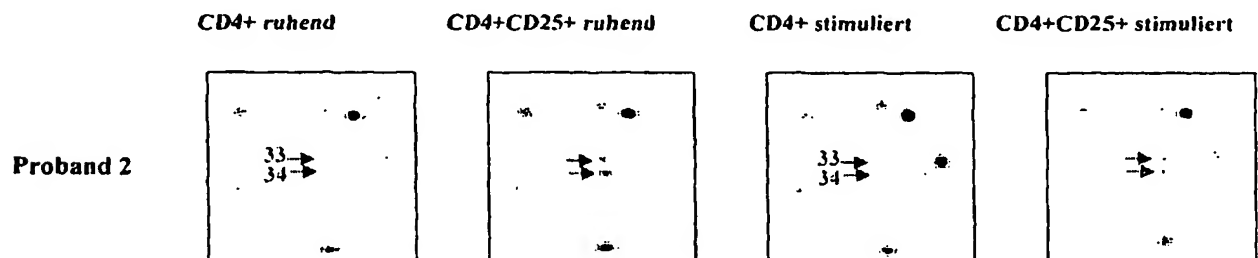


Fig. 4/10

## Vergleich der stimulierten Zellpopulationen

Galectin 1: gi|4504981

beta-galactosidase binding lectin precursor; Lectin, galactose-binding, soluble, 1; galectin

Organismus: Homo sapiens

ACCESSION NP\_002296

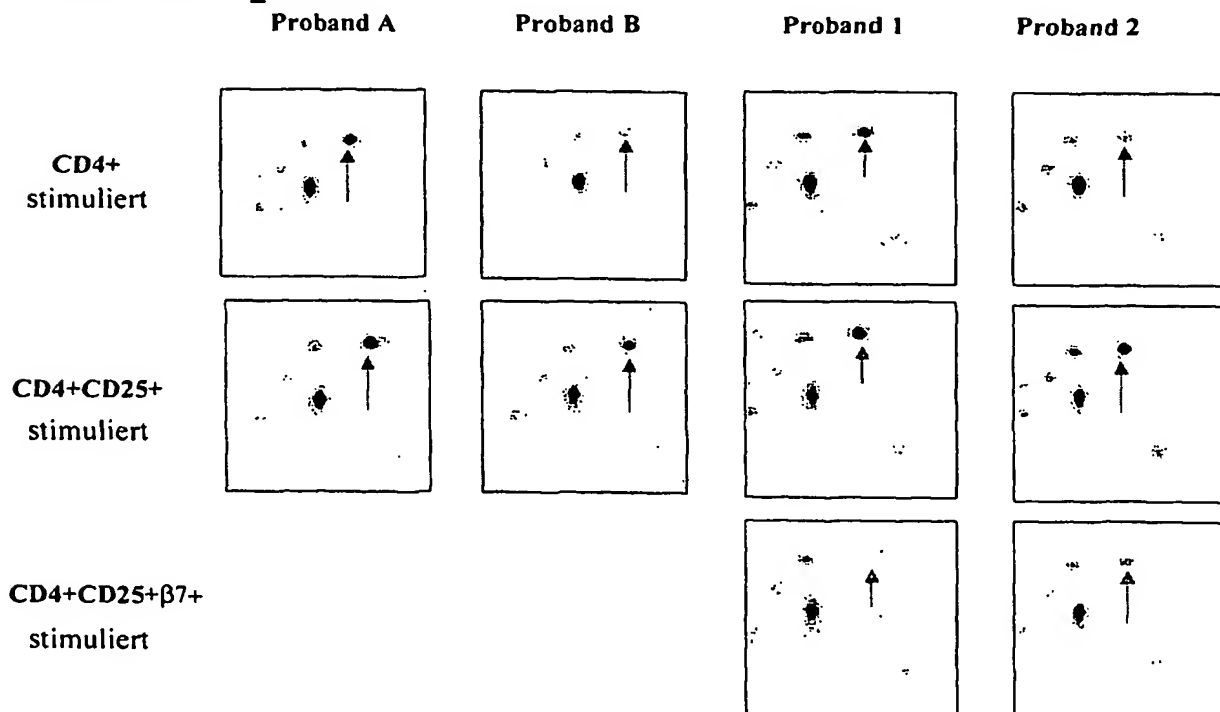


Fig. 5/10

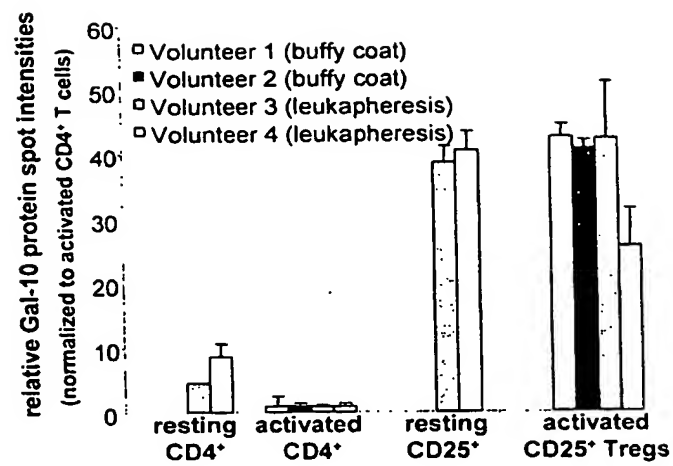


Fig. 6/10

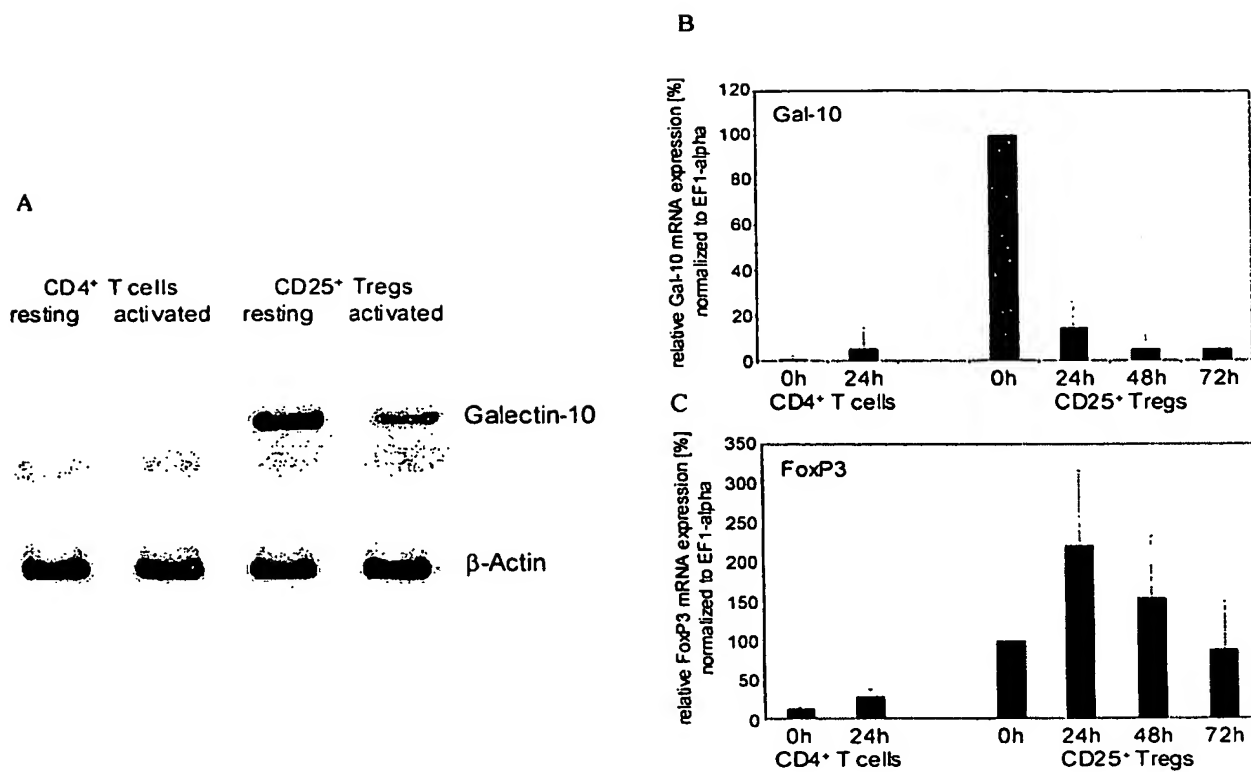


Fig. 7/10

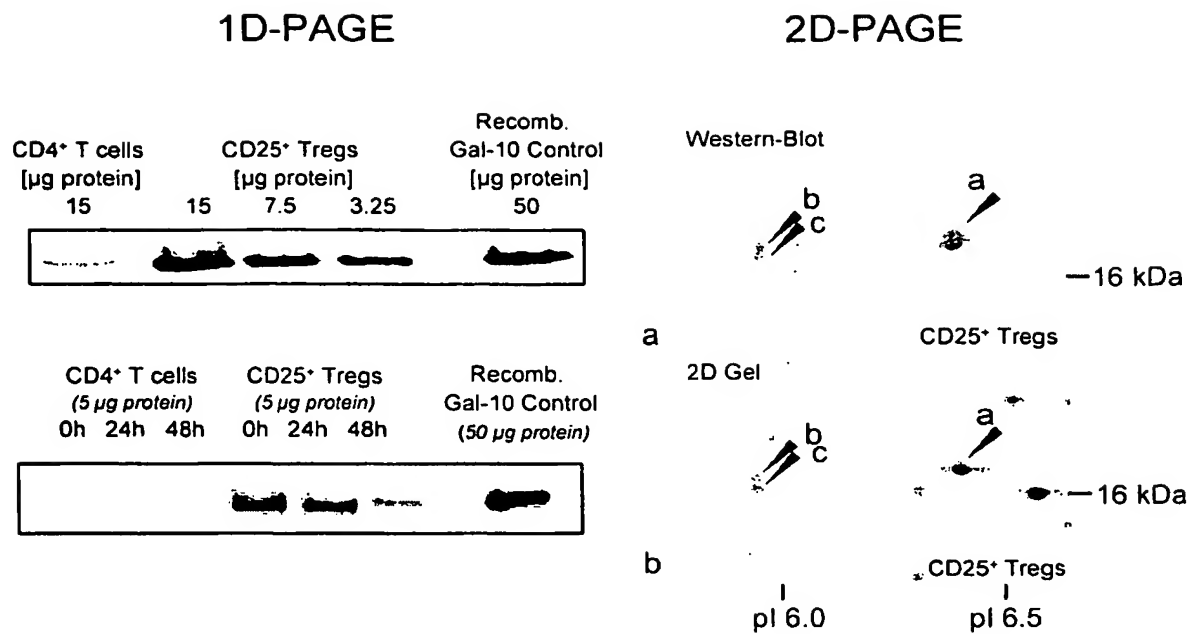
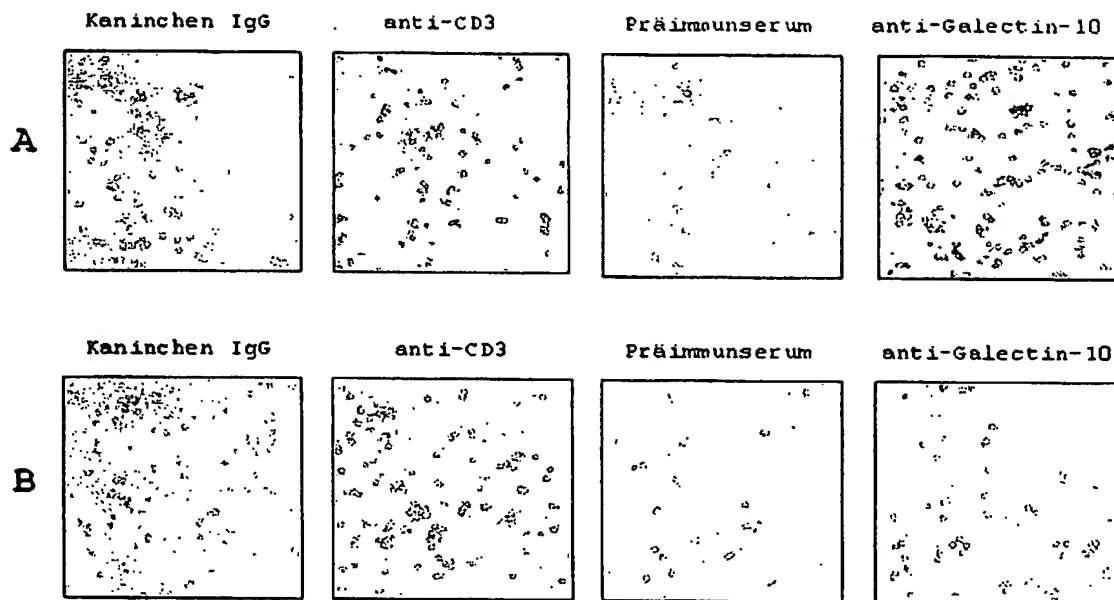


Fig. 8/10



A) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Zellen

B) Konventionelle CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Fig. 9/10

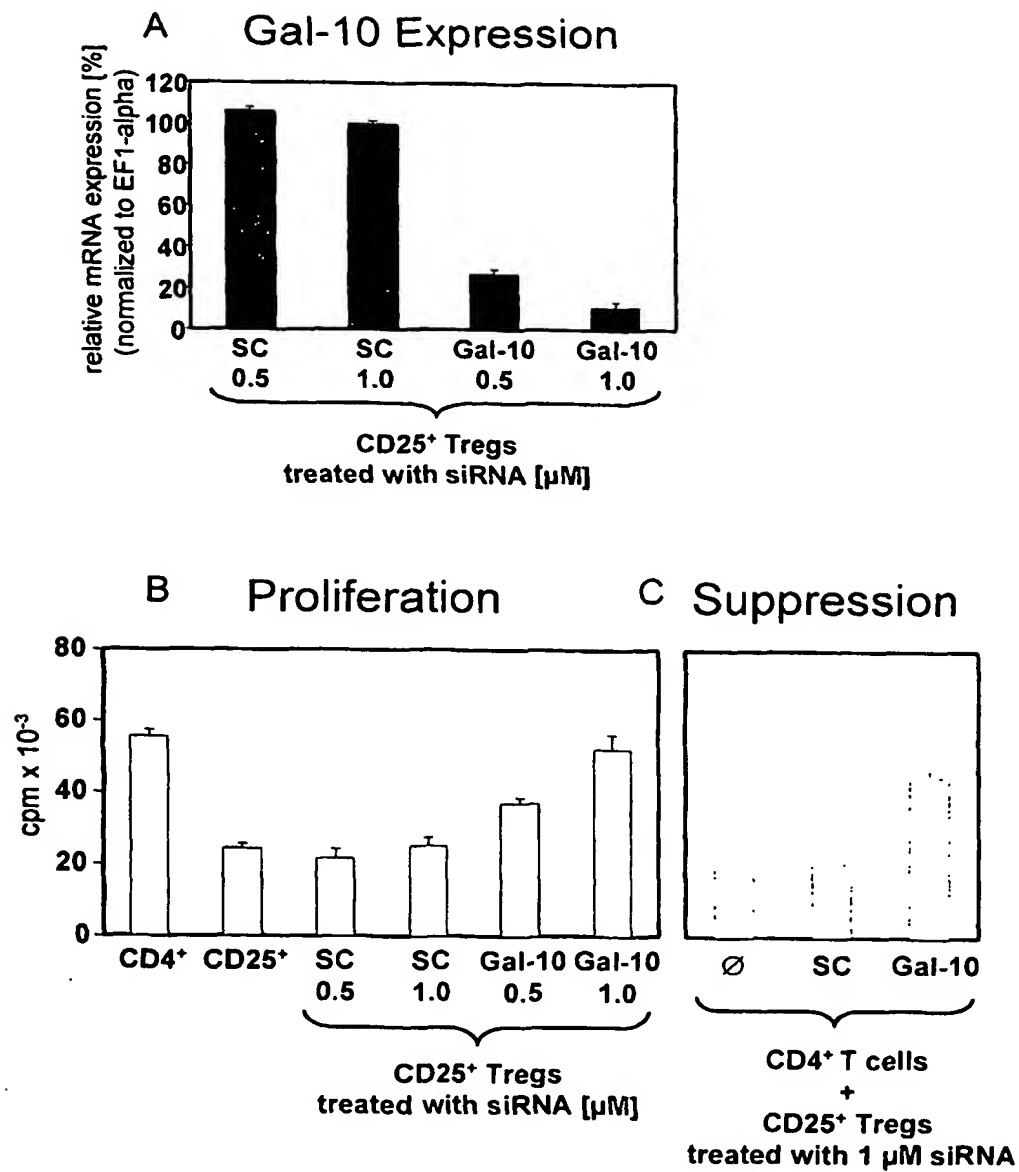
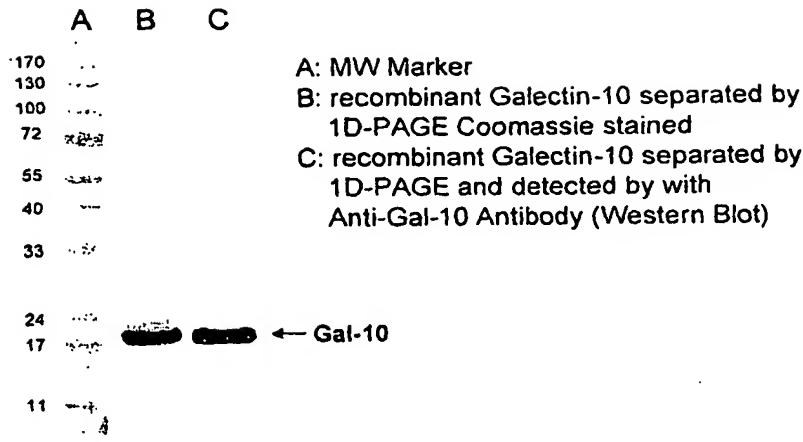




Fig. 10/10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/007890

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/06 C07K14/47 A61K38/00 A61K39/00 C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JONULEIT H ET AL: "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, 4 JUN 2001, vol. 193, no. 11, 4 June 2001 (2001-06-04), pages 1285-1294, XP002310837 ISSN: 0022-1007 cited in the application	1-12
Y	the whole document ----- -/-	13-28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 December 2004

Date of mailing of the international search report

04/01/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heder, A

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PICCIRILLO C A ET AL: "Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 AUG 2001, vol. 167, no. 3, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 1137-1140, XP002310838 ISSN: 0022-1767 cited in the application	1-12
Y	the whole document	13-28
X	SEDDON B ET AL: "The third function of the thymus." IMMUNOLOGY TODAY. FEB 2000, vol. 21, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 95-99, XP002310839 ISSN: 0167-5699 cited in the application	1-12
Y	the whole document	13-28
X	DIECKMANN D ET AL: "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE. 4 JUN 2001, vol. 193, no. 11, 4 June 2001 (2001-06-04), pages 1303-1310, XP002310840 ISSN: 0022-1007 cited in the application	1-12
Y	the whole document	13-28
X	NG W F ET AL: "Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells." BLOOD. 1 NOV 2001, vol. 98, no. 9, 1 November 2001 (2001-11-01), pages 2736-2744, XP002310841 ISSN: 0006-4971 cited in the application	1-12
Y	the whole document	13-28

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/007890

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SURI-PAYER E ET AL: "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 FEB 1998, vol. 160, no. 3, 1 February 1998 (1998-02-01), pages 1212-1218, XP002310842 ISSN: 0022-1767 cited in the application	1-12
Y	the whole document	13-28
X	THORNTON A M ET AL: "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE. 20 JUL 1998, vol. 188, no. 2, 20 July 1998 (1998-07-20), pages 287-296, XP002310843 ISSN: 0022-1007 cited in the application	1-12
Y	the whole document	13-28
Y	DATABASE EMBL 30 May 2003 (2003-05-30), XP002310845 retrieved from EBI Database accession no. L01664.1 abstract -& DATABASE UniProt 1 June 1994 (1994-06-01), XP002310846 retrieved from EBI Database accession no. Q05315 abstract	1-28
X	US 5 242 807 A (ACKERMAN STEVEN J ET AL) 7 September 1993 (1993-09-07) cited in the application	13-15, 19-21
Y	the whole document	1-12, 16-18, 22-28
X	WO 98/15624 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 16 April 1998 (1998-04-16) cited in the application	13-15, 19-21
Y	the whole document	1-12, 16-18, 22-28

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/007890

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GOLIGHTLY L M ET AL: "Charcot-Leyden crystal protein in the degranulation and recovery of activated basophils." JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY. APR 1992, vol. 51, no. 4, April 1992 (1992-04), pages 386-392, XP009041662 ISSN: 0741-5400 cited in the application</p> <p>-----</p>	
A	<p>DVORAK A M ET AL: "Ultrastructural localization of Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to intracytoplasmic crystals in tumor cells of primary solid and papillary epithelial neoplasm of the pancreas." LABORATORY INVESTIGATION; A JOURNAL OF TECHNICAL METHODS AND PATHOLOGY. MAY 1990, vol. 62, no. 5, May 1990 (1990-05), pages 608-615, XP009041661 ISSN: 0023-6837 cited in the application</p> <p>-----</p>	
A	<p>DVORAK A M ET AL: "Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to granules and intragranular crystals in mature human basophils." LABORATORY INVESTIGATION; A JOURNAL OF TECHNICAL METHODS AND PATHOLOGY. APR 1989, vol. 60, no. 4, April 1989 (1989-04), pages 557-567, XP009041660 ISSN: 0023-6837 cited in the application</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP2004/007890

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**SEE SUPPLEMENTAL BOX**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Continuation of II.2

The current claims 13-22 and 26-28 relate to a disproportionately large number of possible "binders", of which only a small portion are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be supported and disclosed in the above sense, that is the parts concerning antibodies.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, Part C, VI, 8.5) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/007890

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5242807	A	07-09-1993	NONE	
WO 9815624	A	16-04-1998	CA 2268022 A1	16-04-1998
			EP 1012266 A1	28-06-2000
			JP 2001501831 T	13-02-2001
			WO 9815624 A1	16-04-1998
			US 2003040081 A1	27-02-2003
			US 2002150970 A1	17-10-2002
			US 6468768 B1	22-10-2002
			US 6027916 A	22-02-2000



## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N5/06 C07K14/47 A61K38/00 A61K39/00 C12N5/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JONULEIT H ET AL: "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE. 4 JUN 2001, Bd. 193, Nr. 11, 4. Juni 2001 (2001-06-04), Seiten 1285-1294, XP002310837 ISSN: 0022-1007 in der Anmeldung erwähnt	1-12
Y	das ganze Dokument ----- -/-	13-28



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&amp;\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

16. Dezember 2004

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

04/01/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Heder, A

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PICCIRILLO C A ET AL: "Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 AUG 2001, Bd. 167, Nr. 3, 1. August 2001 (2001-08-01), Seiten 1137-1140, XP002310838 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-12
Y		13-28
X	SEDDON B ET AL: "The third function of the thymus." IMMUNOLOGY TODAY. FEB 2000, Bd. 21, Nr. 2, Februar 2000 (2000-02), Seiten 95-99, XP002310839 ISSN: 0167-5699 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-12
Y		13-28
X	DIECKMANN D ET AL: "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE. 4 JUN 2001, Bd. 193, Nr. 11, 4. Juni 2001 (2001-06-04), Seiten 1303-1310, XP002310840 ISSN: 0022-1007 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-12
Y		13-28
X	NG W F ET AL: "Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells." BLOOD. 1 NOV 2001, Bd. 98, Nr. 9, 1. November 2001 (2001-11-01), Seiten 2736-2744, XP002310841 ISSN: 0006-4971 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-12
Y		13-28
	-/--	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SURI-PAYER E ET AL: "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 FEB 1998, Bd. 160, Nr. 3, 1. Februar 1998 (1998-02-01), Seiten 1212-1218, XP002310842 ISSN: 0022-1767 in der Anmeldung erwähnt	1-12
Y	das ganze Dokument	13-28
X	THORNTON A M ET AL: "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE. 20 JUL 1998, Bd. 188, Nr. 2, 20. Juli 1998 (1998-07-20), Seiten 287-296, XP002310843 ISSN: 0022-1007 in der Anmeldung erwähnt	1-12
Y	das ganze Dokument	13-28
Y	DATABASE EMBL 30. Mai 2003 (2003-05-30), XP002310845 gefunden im EBI Database accession no. L01664.1 Zusammenfassung -& DATABASE UniProt 1. Juni 1994 (1994-06-01), XP002310846 gefunden im EBI Database accession no. Q05315 Zusammenfassung	1-28
X	US 5 242 807 A (ACKERMAN STEVEN J ET AL) 7. September 1993 (1993-09-07) in der Anmeldung erwähnt	13-15, 19-21
Y	das ganze Dokument	1-12, 16-18, 22-28
X	WO 98/15624 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 16. April 1998 (1998-04-16) in der Anmeldung erwähnt	13-15, 19-21
Y	das ganze Dokument	1-12, 16-18, 22-28

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
A	<p>GOLIGHTLY L M ET AL: "Charcot-Leyden crystal protein in the degranulation and recovery of activated basophils." JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY. APR 1992, Bd. 51, Nr. 4, April 1992 (1992-04), Seiten 386-392, XP009041662 ISSN: 0741-5400 in der Anmeldung erwähnt</p>	
A	<p>DVORAK A M ET AL: "Ultrastructural localization of Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to intracytoplasmic crystals in tumor cells of primary solid and papillary epithelial neoplasm of the pancreas." LABORATORY INVESTIGATION; A JOURNAL OF TECHNICAL METHODS AND PATHOLOGY. MAY 1990, Bd. 62, Nr. 5, Mai 1990 (1990-05), Seiten 608-615, XP009041661 ISSN: 0023-6837 in der Anmeldung erwähnt</p>	
A	<p>DVORAK A M ET AL: "Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to granules and intragranular crystals in mature human basophils." LABORATORY INVESTIGATION; A JOURNAL OF TECHNICAL METHODS AND PATHOLOGY. APR 1989, Bd. 60, Nr. 4, April 1989 (1989-04), Seiten 557-567, XP009041660 ISSN: 0023-6837 in der Anmeldung erwähnt</p>	

**Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## Fortsetzung von Feld II.2

Die geltenden Patentansprüche 13-22 und 26-28 beziehen sich auf eine unverhältnismässig grosse Zahl möglicher "Binder", von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Artikels 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Artikels 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Masse, dass eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend Antikörper.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/007890

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5242807	A	07-09-1993	KEINE		
WO 9815624	A	16-04-1998	CA	2268022 A1	16-04-1998
			EP	1012266 A1	28-06-2000
			JP	2001501831 T	13-02-2001
			WO	9815624 A1	16-04-1998
			US	2003040081 A1	27-02-2003
			US	2002150970 A1	17-10-2002
			US	6468768 B1	22-10-2002
			US	6027916 A	22-02-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**